

MARIA DEL PIÑAL LUNA

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO/REPARO TECIDUAL
MEDIANTE UMA “COLA BIOLÓGICA” PRODUZIDA A PARTIR
DE ESPÉCIES DA FLORA BRASILEIRA ASSOCIADAS À
BACTÉRIA *CAULOBACTER CRESCENTUS*.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Odontologia, do Centro de
Ciências da Saúde, da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Odontologia - Área de
Concentração: Implantodontia.

Orientador: Dr. Ricardo de Souza Magini
Coorientadora: Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

Florianópolis
2012

?

?

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.**

del Piñal, Maria

Avaliação da regeneração/reparo tecidual mediante uma
"cola biológica" produzida a partir de espécies da flora
brasileira associadas à bactéria *caulobacter crescentus*
[dissertação] / Maria del Piñal ; orientador, Ricardo de
Souza Magini ; co-orientador, Mabel Mariela Rodríguez
Cordeiro. - Florianópolis, SC, 2012.

108 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. I. de Souza Magini, Ricardo. II.
Rodríguez Cordeiro, Mabel Mariela. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. IV. Título.

Maria del Piñal Luna

**AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO/REPARO TECIDUAL
MEDIANTE UMA “COLA BIOLÓGICA” PRODUZIDA A PARTIR
DE ESPÉCIES DA FLORA BRASILEIRA ASSOCIADAS À
BACTÉRIA *CAULOBACTER CRESCENTUS*.**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “MESTRE EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Florianópolis, 21 de novembro de 2012.

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
da Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador

Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhaes Benfatti
Membro

Profª. Dra. Eliane Maria Goldfeder
Membro

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Suplente

?

?

Com carinho, dedico esta dissertação,

A minha família pelo imenso amor, dedicação e humildade. Em especial a meus pais, **José e Fernanda** por me apoiar e acreditar em minhas escolhas, permitindo que meus sonhos se tornem realidade e pelo exemplo de força para superar todos os obstáculos sempre.

Às minhas irmãs, **Isabel y Lola**, amigas de todas as horas e circunstâncias, pela tranquilidade e apoio transmitido e pela felicidade de tê-las ao meu lado.

As minhas sempre amigas **Belén, Beatriz, Raquel e Annalisa** presentes em mim a cada dia, embora fisicamente longe, me ensinaram e me ensinam o verdadeiro valor da amizade. A enorme confiança transmitida em mim alimenta minha vontade de crescer.

?

?

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Professores, cada um de vocês é para mim uma fonte de inspiração...

A Profa. Dra Eliane Maria Goldfeder, desde o primeiro dia que nos conhecemos, você fez diferença no meu caminho profissional e pessoal. O longo e maravilhoso tempo compartilhado contigo me mostrou a docente que eu gostaria de ser. Você é uma autentica referencia para mim. Sincera, alegre até nos momentos difíceis, sempre disponível e com enorme vontade de ajudar. A você devo esta pesquisa. Não tenho palavras para expressar o orgulho que tenho de ter sido sua aluna.

À Profa. Dra. Prof. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, pela orientação neste trabalho e pelas sugestões apresentadas. Obrigada pela paciência e pelo dom de esclarecer e simplificar as minhas dúvidas, sempre.

Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, obrigada por abrir as portas do seu laboratório e me receber como sua aluna, pelo carinho e atenção durante todo o nosso trabalho, por sua presença constante e pelo exemplo como pessoa e professor.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini, que junto a Cintia Schiochett e Daisy de Souza Magini formam “minha família brasileira”, obrigada por abrir as portas de sua casa cada domingo e me receber em sua família, esses momentos ajudaram a aplacar as saudades de casa! Ricardo, obrigada por acreditar no meu trabalho, me incentivar na área docente e da pesquisa, e pela confiança depositada em mim desde o inicio. Tua companhia tem me proporcionado um enorme crescimento pessoal e profissional. Seu dom de orador é admirável, você é um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhaes Benfatti obrigada por me orientar no momento em que precisei, pelas oportunidades colocadas em meu caminho, pela disponibilidade e por compartilhar seus aprendizados.

?

?

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini**, obrigada pelo exemplo de persistência e força, acreditando sempre na nossa odontologia e pela incessante busca pelo melhor.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**, obrigada por sua imensa sabedoria em trabalhar as qualidades de cada aluno, por sua carinhosa atenção em todos os momentos, ouvindo nossos anseios e expectativas, por sua postura contestadora e pelo exemplo de vida. Obrigada por fazer parte desta trajetória.

A minha doce amiga **Roberta Wienke Ferreira**, obrigada por sua presença sempre alegre, por compartilhar comigo todos os momentos dessa trajetória, pela força e dedicação.

A minha querida amiga e colega do mestrado **Isis Carvalho Encarnação**, presente mais que ninguém no meu dia a dia, é com enorme admiração que escrevo seu agradecimento. Generosa, alegre, paciente e lutadora. Sempre me incentivando a fazer mais e melhor. A sua confiança depositada em mim tem me dado segurança a cada dia. Eternamente agradecida pelos conhecimentos e dicas compartilhadas e pela ajuda incondicional nesta pesquisa. Os momentos profissionais e pessoais compartilhados juntas tem sido um ensino constante, você é parte de mim!

A minha queridíssima amiga **Tcheli Cassel de Araujo** que no percorrer do caminho junto com a Isis tornaram-se minhas “irmãs” brasileiras. Graças pela amizade sincera e verdadeira. Você é uma parte fundamental desta experiência!

Ao meu amigo e colega do mestrado **Carlos Clessius Ferreira Xavier** obrigada por sua prontidão e companhia e pela enorme paciência com as minhas ansiedades. Muito agradecida pelos conhecimentos e dicas compartilhadas. Você é para mim fonte de inspiração, incansável lutador e parceiro fundamental. Obrigada pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa, aprendi muito com você.

Ao meu amigo e colega do mestrado **Ivan Contreras Molina** que junto a Isis e Clessius me ensinaram dia a dia o real significado e importância do trabalho em equipe. Obrigada pelos valores

transmitidos, a sua autenticidade, sinceridade e transparência é invejável. Sua paixão e dedicação pela odontologia é contagiante, graças pela troca de experiências pessoais e profissionais, você fez diferença nesta trajetória.

Ao aluno da graduação **Abraão Moratelli Prado** pela ajuda incondicional prestada na análise dos resultados deste trabalho, muito obrigada!

A **Carolina Bullen e Rafaella Monteiro Cid Oliveira** agradeço pelos 2 anos de convívio que originaram uma sincera amizade, pela trajetória de nossas vidas que passamos juntos, por compartilharem os desafios, as experiências, as incertezas e, principalmente, pelo crescimento pessoal proporcionado por nosso convívio.

A todos os amigos de mestrado citados acima e ainda ao **Guenther Schuldt Filho, Eduardo Vilain de Melo e José Moisés Souza Jr.**, agradeço pela trajetória de nossas vidas que passamos juntos e pelo crescimento pessoal proporcionado por nosso convívio.

Aos meus amigos e colegas do doutorado **Armando Lopes Pereira Neto, Ernesto Barquero Cordero, João Gustavo Oliveira de Souza, Newton Bergamaschi Lucciari e Pâmela Cândida Ribas de Andrade**, obrigada pelo acolhimento e pela troca de experiências

Aos técnicos do Laboratório de técnicas histológicas do departamento de ciências morfológicas, muito obrigada pela ajuda!

Às funcionárias do Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários - CEPID, **Mirian, Gisela e Silvane** pelo trabalho diário e a **Nilcéia** por sua alegre presença.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!!!

?

?

?

“Eu sei que não sou nada e que talvez nunca tenha tudo. Aparte isso, eu tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

2

2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema explicativo da metodologia utilizada

Figura 2. Elaboração da mistura adesiva

Figura 3. Localização das incisões no dorso do animal

Figura 4. Aplicação da cola biológica.

Figura 5. Aplicação do Histoacryl®.

Figura 6. Remoção das amostras.

Figura 7. Preparo das peças para a microtomia e montagem das lâminas.

Figura 8. Processamento das fotografias para avaliação da área de cicatrização.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo do processamento para avaliação histológica

Tabela 2. Protocolo para o tratamento e preparo das amostras para análise histológica.

Tabela 3. Protocolo de coloração histológica.

?

?

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CA – *Cianocrilato*

NBCA - N-butil-2-cianoacrilato

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos de América

OMS – Organização mundial da saúde

COX-2 - Ciclooxigenase 2

IL-1 β - interleucina 1 beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

IL-6 – interleucina 6

PARS - receptores ativados de proteases

RJ - Resina de Jatobá

BB - Resina do Breu Branco

LA - Leite do Amapá

CB – “Cola Biológica”

VH - Veículo

ST - Sutura

C - Controle

CB+ST - “Cola biológica” + Sutura

PMNs - leucócitos polimorfonucleares

EGF - Fator de crescimento epidérmico

KGF – Fator de crescimento de queratinócitos

TGF- β 1 – Fator de crescimento transformador beta 1

MFBs – Miofibroblastos

ECM – Matriz extracelular

NO – Óxido nítrico

p – Valor de p

μ l – Microlitro(s)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

kg – Quilograma(s)

cm - centímetro

ANOVA 2 – Análise de variância de 2 vias

– Menos

+ – Mais

= – Igual

< – Menor

> – Maior

?

?

LUNA, M. D. P. **Avaliação da regeneração/reparo tecidual mediante uma “cola biológica” produzida a partir de espécies da flora brasileira associadas à bactéria *Caulobacter crescentus***. 2012. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Este estudo avaliou o uso de uma “cola biológica” na regeneração/reparo tecidual em lesões produzidas na dorso de ratos. Foram criadas incisões de 2 centímetros de comprimento e espessura até a hipoderme no dorso de 36 animais que foram divididos em 9 grupos: *Cianocrilato*, Resina de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L), Resina do Breu Branco (*Protium heptaphyllum*), Leite do Amapá (*Brosimum painariodes*), “Cola Biológica”, Veículo (*Caulobacter crescentus*), Sutura, Controle e “Cola biológica” + Sutura. As amostras foram obtidas com 1, 3, 7 e 10 dias pós-operatórios para coleta das amostras teciduais destinadas a avaliação histológica. Todas as amostras foram fotografadas para avaliação da área de cicatrização. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações ($p < 0,05$). No primeiro dia do pós-operatório, evidenciou-se em todos os grupos ausência da continuidade da epiderme e da derme, a exceção do grupo sutura. No terceiro dia, nos grupos “cola”, sutura e cianocrilato, a derme apresentou-se parcialmente revestida por células de natureza epitelial, diferentemente dos demais grupos nos quais não foi possível observar esse revestimento, e a rede de fibrina ocupava uma área mais extensa. No sétimo dia, a área de tecido de granulação estava mais reduzida nos grupos sutura e “cola + sutura”. No décimo dia, a área cicatricial apresentava-se maior e mais celularizada nos grupos Leite de Amapá, Veículo, Resina de Jatobá e Breu Branco. Os níveis de índice de lesão apresentaram diferenças no primeiro dia entre os grupos controle e sutura, controle e cianocrilato, “cola” e sutura, “cola” e controle ($p < 0,05$). Nos demais períodos foram equivalentes. Tanto a cola como os estratos das plantas que a constituem apresentaram resultados similares ao grupo controle em todos os tempos experimentais.

?

?

Conclui-se que a “cola biológica” não apresentou propriedades adequadas para manter as bordas da lesão unidas. A sutura continua sendo a técnica de eleição para a aproximação das bordas, porém pode-se sugerir a utilização alternativa do cianocrilato, em função dos resultados obtidos, comparáveis a sutura.

Palavras-chave: “cola biológica”, sutura, cianocrilato, reparo, epiderme.

LUNA, M. D. P. Evaluation of the tissue regeneration / repair through a "biological glue" produced from species of brazilian flora associated with the bacteria *Caulobacter crescentus*. Dissertation (Master's Degree in Dentistry – Concentration Area in Implant Dentistry) – Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis.

ABSTRACT

This study evaluated the use of a "biological glue" in the regeneration / repair of tissue lesions produced in the back of rats. Incisions were created 2 centimetres in length and thickness to the hypodermis on the back of 36 rats, that were divided into 9 groups: cyanoacrylate, Jatoba resin (*Hymenaea courbaril* L), Breu Branco Resin (*Protium heptaphyllum*), Amapá Resin (*Brosimum painariodes*), "biological glue", Vehicle, Suture, Control, "biological glue" + Suture. Tissue sample collection was performed on postoperative days 1, 3, 7 and 10 for histological evaluation. All samples were imaged to assess the healing area. Data were statistically analyzed using ANOVA followed by post-hoc tests ($p < 0.05$). On day 1, it was observed in all groups lack of continuity of the epidermis and dermis, with the exception of the suture group. On day 3, in the groups "glue", suture and cyanoacrylate, the dermis appeared partially lined by epithelial cells, unlike other groups where it was not possible to observe this coating, and fibrin network occupied a larger area. On day 7, area of granulation tissue was lower in the groups suture and "glue" + suture. On day 10, the scar area was more pronounced and more cellularity in the groups Vehicle, Amapá, Breu Branco and Jatobá Resin. The levels of healing area showed differences on the first day between the control group and suture, cyanoacrylate and control, "glue" and suture, "glue" and control ($p < 0.05$). In the other periods results were equivalent. Both "glue" and plants strata showed similar results to the control group at all experimental times. We conclude that "biological glue" had no suitable properties to maintain the incision edges together. The suture remains the technique of choice for approximating the edges, but can be suggested the alternative use of cyanoacrylate, according to the excellent results, comparable to suture.

?

?

Keywords: "biological glue" suture, cyanoacrylate, repair epidermis.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA | 23 |
| ARTIGO | 29 |
| REFERÊNCIAS | 57 |
| BIBLIOGRAFIA CONSULTADA..... | 65 |
| Apêndice A – Metodologia expandida..... | 73 |
| Apêndice B – Figuras da metodologia expandida | 70 |
| Apêndice C- Tabelas da metodologia expandida | 91 |
| Apêndice D- Elaboração da “cola biológica” | 93 |
| Anexo A –Normas do Periódico | 97 |
| Anexo B – Produção científica durante o Mestrado | 107 |

?

?



INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A pele constitui o maior órgão do corpo, representando 15-20% da massa total deste. É formada pela epiderme, composta de um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, na qual quatro estratos podem ser identificados: basal, espinhoso, granuloso e córneo, e pela derme. Esta última é composta de tecido conjuntivo organizado em duas camadas distintas: papilar, formada por tecido conjuntivo frouxo e responsável pela formação das papilas dérmicas e a reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado. O queratinócito é a célula predominante da epiderme. A ligação da epiderme na derme é reforçada por um aumento na interface entre os dois tecidos, representado por interdigitações entre os dois tecidos, denominadas cristas epidérmicas e papilas dérmicas. Igualmente os hemidesmosmos conectam a membrana plasmática das células epiteliais e a membrana basal mediante filamentos de ancoragem; as fibrilas de ancoragem unem a membrana basal ao tecido conjuntivo. A camada papilar da derme, diferentemente da derme reticular, é mais celular e as fibras colágenas são menos densas. (ROSS, ROMRELL e KAYE, 1995).

No rompimento da continuidade dos tecidos que formam a pele, seja por causa acidental ou em procedimentos cirúrgicos, o rápido reparo do tecido lesado sempre é desejável. Um requisito importante para o reparo é que as margens das lesões sejam aproximadas em íntimo contato para facilitar a cicatrização. Métodos mecânicos como a sutura têm sido comumente utilizados para o controle do sangramento, e fechamento da ferida (MINOZZI et al., 2009). Um inconveniente frequente deste método é a ocorrência de trauma aos tecidos vizinhos, tais como reações inflamatórias decorrentes de falhas da síntese da ferida cirúrgica (deiscência), por tanto a redução da incidência de complicações ainda é de grande importância nesses procedimentos, pois evita o aparecimento de contaminação do campo operatório, sangramento, morbidade e cicatrizes teciduais (KJAERGARD, 2001). Neste sentido, iniciam-se a busca por métodos que substituam a sutura que favoreçam a aproximação e manutenção das bordas da ferida, entre eles, o uso de

adesivos teciduais se apresenta como uma alternativa para a fixação do tecido (STERNBERG et al., 2010).

Os cianoacrilatos (CAs) são agentes bacteriostáticos formados a partir da reação química entre formaldeído e um éster cianoacetato (SHAPIRO et al 2001). Polimerizam exotermicamente na presença de água ou sangue, ligando-se na superfície aplicada em 5-6 segundos até atingir a fase final de polimerização em 60 segundos (KUKLETA et al., 2011). Uma vez polimerizado, produz uma barreira antimicrobiana eficaz contra agentes infecciosos ou patogênicos especialmente contra bactérias gram positivas (QUINN et al 1995,1997; LOSI et al., 2010). O adesivo é eliminado do tecido por degradação hidrolítica, um processo cuja duração varia de acordo com o tipo de tecido e a quantidade de produto aplicado (KUKLETA et al., 2011). Na epiderme os CAs são eliminados espontaneamente de 5 a 10 dias após a aplicação (SINGER, 2008).

Existem vários tipos de CAs (metil-2-cianoacrilato, etil-2-cianoacrilato, n-butil-2-cianoacrilato e Octil-2-cianoacrilato), as propriedades físico-mecânicas de cada um deles distinguem-se pelo número de carbonos na sua cadeia lateral (LEGGAT, 2004, 2007). O N-butil-2-cianoacrilato (NBCA) ou embucrilato é um CA com quatro carbonos em sua cadeia lateral, comercializado sob vários nomes “fantasia” (Histoacryl®, Indermil®, Glubran®, LiquiBand®)¹. O aumento do comprimento da cadeia lateral contribui na redução da toxicidade, diminuindo a taxa de degradação da molécula e das substâncias tóxicas liberadas (LEGGAT et al., 2004, 2007). O NBCA tem sido usado como um adesivo na área médica ou como agente hemostático desde 1970 (AMIEL, 1999; ESPOSITO et al., 2004) mas só no ano 2007 foi aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos de América (FDA, na sua sigla em inglês) para uso externo. Tem sido utilizado para o fechamento de incisões cirúrgicas na cabeça, abdome e mucosa bucal (CHIBBARO E TACCONI, 2009; GENNARI et al., 2004; GIRAY., et al 1997, MUGLALI et al., 2001), reparo laparoscópico de hérnias inguinais (LOSI et al., 2010; KUKLETA 2011; TESTINI et al., 2010), tratamento e profilaxia de varizes gástricas (KANG et al., 2011), como agente hemostático (AL-BELASY e AMER,



2003), e na pediatria em lacerações em vários locais do corpo (AMIEL, 1999).

Atualmente, um adesivo cirúrgico com melhores propriedades constitui ainda uma grande demanda. Neste sentido, desenvolveu-se uma “cola biológica” que caracteriza-se pela mistura feita com substâncias da flora brasileira associada à bactéria *Caulobacter crescentus*. O *Caulobacter* compreende uma família de bactérias gram-negativas unicelulares, não é patogênica e não se replica dentro de um hospedeiro mamífero (BHATNAGAR et al., 2006). Pode ser isolada da água do rio, da água doce, água do canal, água de poço, água da lagoa, água da torneira e do mar, e estão presentes em elevada quantidade no solo (POINDEXTER 1964, 1981). O *Caulobacter crescentus* tem um ciclo de vida dimórfico com um estágio de células móveis natatórias (*swarmer cells*) durante o qual a adesão inicial nas superfícies acontece, seguido pela diferenciação da célula natatória em uma sem motilidade que contém uma extensão polar chamada de talo ou haste (*stalked cells*). A haste possui uma prolongação de material adesivo de polissacarídeos (*grampo* ou *holdfast*) que permite a forte fixação da bactéria nas superfícies. O material adesivo permite que as células em qualquer fase possam se unir a outros microrganismos, substratos inanimados, ou com outras hastes para formar rosetas (POINDEXTER 1964, 1981; BODENMILLER et al., 2004). A força adesiva do *Caulobacter crescentus* é a mais forte entre as células microbianas, pois suas características anatômicas e composição química permitem manter um peso de até 680 kg sobre uma superfície molhada, tornando-o um excelente candidato como um adesivo cirúrgico biodegradável (TSANG et al., 2006).

Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados, direta ou indiretamente, de plantas medicinais (OMS, 2011). Em alguns casos particulares, tais como drogas antitumorais e antimicrobianos, cerca de 60% dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado e a maioria daqueles na fase final de ensaios clínicos são fitoterápicos (HARVEY et al., 2008). As substâncias empregadas na elaboração da “cola biológica” referem-se aos extratos de *Protium heptaphyllum*, *Hymenaea courbaril* L e *Brosimum*

painariodes. Os respectivos extratos são popularmente conhecidos como “Breu Branco”, “Resina de Jatobá” e “Leite do Amapá”. Estas espécies ricas em compostos terpênicos possuem propriedades antiinflamatórias e antimicrobianas (SUSUNAGA et al., 2001; SIANI et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004, 2005; CARTAXO et al., 2010).

Os terpenóides (também chamados de isoprenóides ou isopentenóides) são metabólitos secundários formados a partir de uma unidade estrutural básica: o isopreno, com uma extraordinária diversidade no reino vegetal. Os terpenos constituem uma extensa e numerosa família de produtos naturais, com potencial para auxiliar no processo de cura das feridas. A maioria dos metabólitos secundários derivados de plantas são conhecidos por interferir direta ou indiretamente com as seguintes moléculas e / ou mecanismos: diversos mediadores inflamatórios (e. g. metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, etc), a produção e / ou ação de mensageiros secundários, a expressão de fatores de transcrição e a expressão das principais moléculas pró-inflamatórias, tais como NO sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase (COX-2), as citocinas (IL-1 β , TNF- α , etc), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO et al., 2003).

O “Breu Branco” é rico em triterpenos, tais como α e β amirina (SUSUNAGA et al, 2001). Numerosos artigos científicos informam que, a mistura de α e β amirina possui, entre outras características, propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (SIANI et al., 1999; OLIVEIRA et al, 2004). O óleo essencial do “Breu Branco” extraído da resina reduz a liberação de óxido nítrico e atrasa a migração das células inflamatórias em modelos de inflamação induzida (SIANI et al., 1999). Esses efeitos parecem estar associados com a supressão dos níveis tissulares da prostaglandina E2 (PGE2) por mecanismos que envolvem a supressão da expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) (MEDEIROS et al., 2007). Igualmente, esses triterpenos modulam a inflamação periodontal aguda mediante a redução do infiltrado neutrofílico, o estresse oxidativo e a produção de citocinas pro-inflamatórias como o TNF- α (HOLANDA PINTO et al., 2008). O “Jatobá” é rica em terpenóides (NOGUEIRA, 2001;



ABDEL-KADER et al., 2002; AGUIAR et al., 2010) e açúcares oligoméricos (LIMA et al., 1995; BUCKERIDGE et al., 1997). Os xiloglucanos, obtidos das sementes da pranta estimulam a ativação do processo de fagocitose, evidenciado pela secreção de mediadores da inflamação (TNF- α , IL-1, IL-6 e óxido nítrico) (DO ROSÁRIO et al., 2011). O amapá-doce, pertencente à família Moraceae, é uma espécie arbórea da qual um tipo de látex pode ser extraído de seus troncos, popularmente conhecido como “leite do Amapá-doce”. As proteases, encontradas no látex da família Moraceae parecem desempenhar papéis importantes na regulação dos processos biológicos (DOMSALLA & MELZIG, 2008). Devido à importância das proteases na transdução de sinais via receptores ativados de proteases (PARS), este tipo de enzima parecem ser muito interessantes para a indústria farmacológica. Os PARS estão envolvidos na regulação da homeostasia e trombose, bem como em respostas inflamatórias e proliferativas desencadeadas por lesão vascular (COUGHLIN, 2005).

Dada a importância da obtenção de métodos que permitam as vantagens de um fechamento dos tecidos por primeira intenção, sem exposição aos riscos da utilização dos métodos mecânicos, torna-se necessário o desenvolvimento e aprofundamento de pesquisas sobre o tema. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar, *in vivo*, o efeito de uma cola biológica obtida de estratos resinosos associados à bactéria *Caulobacter crescentus* na resposta tecidual de feridas cirúrgicas.

Objetivos Específicos:

a) Avaliar e comparar diariamente, mediante observações e fotografias, sinais clínicos de inflamação (vermelhidão, edema), infecção, deiscência e fibrose derivados da utilização de técnicas de sutura, cianocrilato e os componentes da mistura adesiva isolados ou em associação (“cola biológica”);

b) Analisar comparativamente, em cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson, a morfologia tecidual, nos períodos de 1, 3, 7, e 10 dias após o fechamento das feridas cirúrgicas.



ARTIGO EM PORTUGUÊS

O artigo a seguir foi formatado de acordo com as Normas para Elaboração de Artigos do periódico Surgery

AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO/REPARO TECIDUAL MEDIANTE UMA COLA BIOLÓGICA PRODUZIDA A PARTIR DE ESPÉCIES DA FLORA BRASILEIRA ASSOCIADAS À BACTÉRIA CAULOBACTER CRESCENTUS.

Maria del Piñal Luna⁽¹⁾ Eliane Maria Goldfeder⁽²⁾ Adair Roberto Soares dos Santos⁽³⁾ Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro⁽⁴⁾ Ricardo de Souza Magini⁽⁵⁾

(1) Mestranda em Implantodontia na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (mpinalluna@gmail.com).

(2) Professora Doutora do Programa de Ciências biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (goldfeder@ccb.ufsc.br)

(3) Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (arssantos@ccb.ufsc.br)

(4) Professora Doutora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (m.cordeiro@ufsc.br)

(5) Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (magini@ccs.ufsc.br)

Título resumido: Avaliação de uma “cola biológica” no reparo/regeneração tecidual

Palavras-Chave: “cola biológica”, sutura, cianocrilato, reparo, pele.



RESUMO

Este estudo avaliou o uso de uma “cola biológica” na regeneração/reparo tecidual em lesões produzidas na dorso de ratos. Foram criadas incisões de 2 centímetros de comprimento e espessura até a hipoderme no dorso de 36 animais que foram divididos em nove grupos: *Cianocrilato*, Resina de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L), Resina do Breu Branco (*Protium heptaphyllum*), Leite do Amapá (*Brosimum painariodes*), “Cola Biológica”, Veículo, Sutura, Controle e “Cola biológica” + Sutura. Os animais foram sacrificados nos 1, 3, 7 e 10 dias pós-operatórios. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações ($p < 0,05$). Na avaliação histológica os grupos cianocrilato, e a “cola” com a sutura apresentaram os melhores resultados em quanto a reparo da epiderme e regeneração da derme. Os níveis de índice de lesão apresentaram diferença no primeiro dia entre os grupos controle e sutura, controle e cianocrilato, cola e sutura, cola e controle ($p < 0,05$). Nos demais períodos foram equivalentes. Tanto a cola como os estratos das plantas que a constituem apresentaram resultados similares ao grupo controle em todos os tempos experimentais. Conclui-se que a “cola biológica” não apresentou propriedades adequadas para manter as bordas da lesão unidas. A sutura continua sendo a técnica de eleição para a aproximação das bordas, porem pode-se sugerir a utilização alternativa de forma isolada ou conjunta com à sutura do cianocrilato.



RELEVÂNCIA CLÍNICA

Um adesivo cirúrgico que substitua ou atue em conjunto com a sutura pode reduzir os riscos da utilização dos métodos mecânicos, tais como reações inflamatórias decorrentes de falhas da síntese da ferida cirúrgica (deiscência). Evita-se assim, o surgimento de complicações como a contaminação do campo operatório, sangramento, morbidade e cicatrizes teciduais. Além disso, diminui-se consideravelmente o tempo operatório e alcançam-se resultados estéticos satisfatórios. Neste estudo a “cola biológica” não apresentou propriedades adequadas para manter as bordas da lesão unidas, esse achado indica a necessidade de uma reformulação do produto pois encontram-se na literatura dados que indicam o potencial analgésico e anti-inflamatório dos estratos das plantas empregadas e das propriedades adesivas da bactéria utilizada. O cianocrilato obteve resultados semelhantes a sutura, apresentando também potencial para ser utilizado como agente hemostático e cicatricial na área odontológica.



INTRODUÇÃO

No rompimento da continuidade dos tecidos que formam a pele, seja por causa acidental ou em procedimentos cirúrgicos, o rápido reparo do tecido lesado sempre é desejável. Métodos mecânicos como a sutura têm sido comumente utilizados para o controle do sangramento, e fechamento da ferida (MINOZZI et al., 2009). Um inconveniente frequente deste método é a ocorrência de trauma aos tecidos vizinhos, tais como reações inflamatórias decorrentes de falhas da síntese da ferida cirúrgica (deiscência), por tanto a redução da incidência de complicações ainda é de grande importância nesses procedimentos, pois evita o aparecimento de contaminação do campo operatório, sangramento, morbidade e cicatrizes teciduais (KJAERGARD, 2001). Neste sentido, iniciou-se a busca por métodos que substituam a sutura que favoreçam à aproximação e manutenção das bordas da ferida surgiram, entre eles, o uso de adesivos teciduais se apresenta como uma alternativa para a fixação do tecido (STERNBERG et al., 2010).

Os cianoacrilatos (CAs) são agentes bacteriostáticos, uma vez polimerizados, produzem uma barreira antimicrobiana eficaz contra agentes infecciosos ou patogênicos especialmente contra bactérias gram positivas (QUINN et al 1995,1997; LOSI et al., 2010). O adesivo é eliminado do tecido por degradação hidrolítica (KUKLETA et al., 2011). Na epiderme os CAs são deslocados da superfície espontaneamente de 5 a 10 dias após a aplicação (SINGER, 2008).O N-butil-2-cianoacrilato (NBCA) tem sido usado para o fechamento de incisões cirúrgicas na cabeça, abdome e mucosa bucal (CHIBBARO E TACCONI, 2009; GIRAY., et al 1997; MUGLALI et al., 2011), reparo laparoscópico de hérnias inguinais (LOSI et al., 2010; KUKLETA 2011), tratamento e profilaxia de varizes gástricas (KANG et al., 2011), como agente hemostático (AL-BELASY e AMER, 2003), e na pediatria em lacerações em vários locais do corpo (AMIEL,1999).

Atualmente, um adesivo cirúrgico com melhores propriedades constitui ainda uma grande demanda. Neste sentido, desenvolveu-se uma “cola biológica” que caracteriza-se pela mistura feita com substâncias da flora brasileira associada à

bactéria *Caulobacter crescentus*. O *Caulobacter* compreende uma família de bactérias gram-negativas unicelulares, não é patogênica e não se replica dentro de um hospedeiro mamífero (BHATNAGAR et al., 2006). A força adesiva de esta bactéria é a mais forte entre as células microbianas, pois suas características anatômicas e composição química permitem manter um peso de até 680 kg sobre uma superfície molhada, tornando-o um excelente candidato como um adesivo cirúrgico biodegradável (TSANG et al., 2006).

As substâncias empregadas na elaboração da “cola biológica” referem-se aos extratos de *Protium heptaphyllum*, *Hymenaea courbaril* L e *Brosimum painariodes*. Os respectivos extratos são popularmente conhecidos como “Breu Branco”, “Resina de Jatobá” e “Leite do Amapá”. Estas espécies ricas em compostos terpênicos possuem propriedades antiinflamatórias e antimicrobianas (SIANI et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004; CARTAXO et al., 2010).

Dada a importância da obtenção de métodos que permitam as vantagens de um fechamento dos tecidos por primeira intenção, sem exposição aos riscos da utilização dos métodos mecânicos, torna-se necessário o desenvolvimento e aprofundamento de pesquisas sobre o tema. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar, *in vivo*, o efeito de uma “cola biológica” obtida de extratos resinosos associados à bactéria *Caulobacter crescentus* na resposta tecidual de feridas cirúrgicas.

MATERIAIS E METODOS

Foram utilizados 36 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos (14 – 16 semanas) pesando aproximadamente 350g. Os animais foram mantidos em gaiolas higienizadas e sob condições similares, em sala com 22°C +/- 2°C, 60% +/- 5% de umidade e em ciclo claro/escuro de 12/12h. Os ratos foram alimentados com o padrão de dieta sólida do laboratório e água livre demanda. Para a realização da intervenção cirúrgicas, os ratos foram distribuídos segundo o período experimental e os materiais a serem utilizados. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de Ketamina 10% - 90mg/kg (Synth, Sao Paulo,



Brasil) e cloridrato de Xilazina 2% - 10mg/kg (Synth, São Paulo, Brasil). Para padronizar a localização das incisões para cada animal, utilizou-se como modelo uma placa de acetato elaborada com as dimensões obtidas por meio de um paquímetro. Realizaram-se 4 incisões de 2 cm de comprimento e 2 mm de profundidade com bisturi (Duflex, Brasil) contendo uma lâmina (15, BD, Brasil). Todas as incisões foram realizadas pelo mesmo operador e estendidas até a hipoderme. As bordas da incisão foram divulsionadas 0,5 cm ao redor de cada ferida para permitir um adequado avanço tissular para o fechamento e igualmente para a aplicação do adesivo. A hemostasia, quando requerida, foi realizada com uma leve pressão com gaze. As margens da ferida foram aproximadas manualmente e fechadas com sutura ou com a aplicação de cada material a ser estudado, a ordem dos quais foi randomizada. O fechamento das feridas cirúrgicas, no grupo sutura (ST), foi realizado através de 4 pontos simples em intervalos de 0,5 cm utilizando fio de nylon 5-0 (Shalon, GO, Brasil), provendo a íntima cooptação das bordas, para uma cicatrização por primeira intenção. Nos grupos experimentais resina de Jatobá (RJ), veículo (VH), resina de Breu Branco (BB), Leite de Amapá (LA), “cola biológica” (CB) e “cola biológica” junto com a sutura (CB+ST) as bordas da ferida foram aproximadas manualmente e, com o auxílio de uma pipeta, foram quantificados 50 microlitros (μL) de cada material. Manteve-se a aproximação manual durante dois minutos para permitir a estabilidade do material em cada ferida. No grupo formado pelo cianocrilato (CA), as bordas da ferida foram aproximadas manualmente e uma única camada do material foi aplicada ao longo da incisão, de acordo com as instruções do fabricante. Manteve-se a aproximação da ferida durante 60 segundos após a aplicação para assegurar uma adequada polimerização do material. Todas as aplicações foram realizadas por um único operador para assegurar uniformidade na execução. Todos os animais receberam analgésico dipirona 50mg/kg intraperitonal, após o procedimento cirúrgico, por três dias consecutivos, no período matutino. Os animais foram avaliados diariamente para a observação do estado de saúde e do processo de reparo para avaliar qualquer sinal clínico de inflamação (vermelhidão, edema), infecção e deiscência. Todas as etapas foram fotografadas e os dados arquivados para análise dos resultados. O fechamento completo da ferida, mantendo as bordas da

incisão em aposição, foi considerado como uma cicatrização primária (por primeira intenção) e o fechamento parcial como uma cicatrização secundária (por segunda intenção).

Remoção das amostras e processamento para avaliação histológica

Decorridos 1, 3, 7 e 10 dias os animais foram anestesiados como detalhado previamente. Uma área de 2 x 2,5 cm² de tecido cutâneo foi removida ao redor de cada ferida cirúrgica com o bisturi. As amostras foram imersas em recipientes de vidro, contendo solução de formaldeído tamponado a 10% (Sigma-Aldrich) e mantidas por 24h a 4°C para sua fixação. As amostras foram desidratadas, diafanizadas e impregnadas com parafina. Procedeu-se a microtomia, com a obtenção de cortes semiseriados de 4 mm de espessura. A coloração foi realizada com hematoxilina eosina e tricrômico de masson.

Análise das imagens histológicas

As lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE) foram examinadas ao microscópio de luz com câmera digital acoplada, com objetiva 5x, 10x e 40x para a localização e análise da área de reparo. Após a localização da região, os cortes foram fotografados com aumento de 5x e, em seguida, com aumentos de 10x e 40x para análise de quatro campos microscópicos consecutivos. Os campos microscópicos foram analisados por dois observadores previamente calibrados, percorrendo toda a extensão do tecido, analisando de forma descritiva as seguintes estruturas histológicas: epiderme (presença de figuras de mitose, re-epitelização, diferenciação dos estratos e queratinização) e derme (presença e localização de células inflamatórias, figuras de mitose, identificação dos miofibroblastos, orientação das fibras colágenas e presença de vasos sanguíneos).

Avaliação da cicatrização

As imagens digitais foram adquiridas usando câmera digital (Canon U.S.A., Inc.), e avaliada à área de cicatrização de cada grupo em função de cada tempo experimental (1, 3, 7 e 10 dias). Isto foi avaliado mediante um programa computadorizado (Chptool) baseado em que a área de cicatrização pode ser caracterizada através de espaços de cores adaptativos, modelados estatisticamente para discriminar com maior precisão



entre áreas correspondentes a cicatrização e áreas de tecidos normais (SOBIERANSKI et al., 2009). Previamente, devido a que cada dorso do rato continha quatro incisões com quatro grupos diferentes, um total de 36 imagens foram editadas com um editor de imagens (GIMP 2.6) para recortar cada imagem em quatro imagens iguais e conseguir a padronização do tamanho de cada amostra. Foram obtidas um total de 144 imagens. Em seguida, cada imagem foi analisada no editor de imagens (Adobe Photoshop CS5) com o objetivo de eliminar as cores correspondentes à pele normal e conseguir assim evitar na análise colorimétrica a interferência de cores que poderiam gerar falsos positivos. Para isso, foi selecionada a área da pele normal e corada de cor branco. Finalmente cada imagem foi analisada no Chptool e quantificada à área de cicatrização em relação a área total de cada amostra (Figura 8).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como media + erro padrão da media (E.P.M), utilizando o método de regressão linear através do programa “Graph Pad Prism” (2005, San Diego, CA).

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. Valores de P 0,05 forma considerados indicativos de significância.

RESULTADOS

Análises Histológica

Os resultados serão apresentados para cada período experimental. Esses resultados abordarão os achados morfológicos mais significativos.

Dia 1- Neste período foi possível identificar no grupo ST continuidade da derme devido à aproximação das margens da lesão com esta técnica (Figura 1.A), a área da lesão foi evidente nos demais grupos pela ausência da continuidade da epiderme e da derme (Figura 1.B). Em todos os grupos, ambos os lados da lesão, apresentaram uma crosta formada por um material amorfo, de características eosinófilas, contendo restos de tecido epitelial, material coagulado, células necróticas e infiltrado inflamatório (Figuras 1.C e 1.D). Examinou-se atividade mitótica nas áreas próximas à lesão (Figuras 1.E). Na derme reticular,

próxima da musculatura, observou-se uma rede de fibrina com muito infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN).

Dia 3- Neste período ainda foi possível observar em todos os grupos a presença da crosta contendo um grande número de PMN_s e interposta entre as margens da lesão (Figura 2.A). Entre essas margens e a crosta evidencio-se uma faixa de queratinócitos (Figura 2.B). Nos grupos CB, ST, CN, a derme apresentou-se parcialmente revestida por células de natureza epitelial (Figura 2.C). Entretanto, nos grupos RJ, BB, LA e CB+ST não foi possível observar esse revestimento e a lesão no nível da derme estava preenchida pela rede de fibrina contendo muitas hemácias e células PMN_s (Figura 2.D). A derme reticular nas proximidades da lesão apresentou uma densidade menor dos feixes das fibras colágenas. A rede de fibrina ocupava uma área mais extensa nos grupos RJ, BB, LA, CB+ST, VH e C (Figura 2.E). No grupo CB+ST, embora as margens epiteliais encontravam-se separadas pela crosta, a derme encontrava-se em perfeita continuidade, sem resquícios da área de fibrina, exceto por uma pequena faixa que indica o local da incisão (Figura 2.F).

Dia 7: Neste período experimental, todos os grupos mostravam a epiderme regenerada contendo todos os estratos diferenciados, com destaque para o estrato espinhoso que possui um aspeto mais espessado quando comparado com o epitélio mais afastado da lesão (Figuras 3.A e 3.B). Em relação à derme existia a presença de tecido de granulação, em franco processo de diferenciação onde já podiam ser observados fibroblastos, miofibroblastos e, vasos sanguíneos com morfologias características (Figuras 3.C e 3.D). Em todos os grupos a derme papilar ainda apresentava tecido de granulação com infiltrado leucocitário (Figura 3.E); na derme reticular, a área de tecido de granulação estava mais reduzida nos grupos ST e CB+ST (Figura 3.A). Observou-se reações granulomatosas à corpo estranho na derme reticular (Figura 3.F).

Dia 10- Observou-se neste período continuidade epitelial ao longo de toda a superfície (reepitelização) (Figura 4.A). O epitélio ainda encontrava-se espessado nos grupos CB+ST, RJ, VH, LA, BB e C (Figura 4.B). A área cicatricial apresentava-se maior e mais celularizada nos grupos LA, VH, RJ, BB (Figura 4.C).



Avaliação da cicatrização

A figura 5.A apresenta os resultados do índice de lesão pós-operatória entre os grupos Controle, Sutura e Cianocrilato. Pode-se observar que o índice de lesão foi significativamente maior no grupo controle. A sutura e o cianocrilato apresentaram um padrão de cicatrização similar. Porém, a sutura demonstrou melhores resultados para os tempos de análise de 1, 3 e 7 dias. Em contrapartida, ao décimo, os resultados para ambos grupos foram praticamente idênticos. Essas observações não foram estatisticamente significativas.

A figura 5.B apresenta os resultados do índice de lesão pós-operatória entre os grupos Controle, Sutura e “Cola biológica”. Pode-se observar que a “cola” apresentou um padrão de cicatrização similar ao controle, sem diferenças significativas entre ambos os grupos, para todos os tempos experimentais. O índice de lesão, no primeiro dia, no grupo da “cola”, foi significativo em relação à sutura, enquanto que nos demais períodos avaliados o índice de lesão foi ligeiramente menor que o controle.

A figura 5.C evidencia os resultados do índice de lesão pós-operatória entre os grupos Controle, Cianocrilato e “Cola biológica”. O índice de lesão com a utilização da “cola” no primeiro dia foi significativamente maior em relação ao cianocrilato. No terceiro dia a “cola” mostrou níveis de índice de lesão ligeiramente menores porém, é possível observar que, nos demais períodos, a “cola” apresentou maior índice de lesão que o cianocrilato.

A figura 5.D mostra os resultados do índice de lesão pós-operatória entre os grupos Controle, “Cola biológica”, Breu Branco, Resina Jatobá e Leite de Amapá. Tanto a “cola” como os estratos das plantas que a constituem apresentaram resultados similares ao grupo controle em todos os tempos experimentais, e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

DISCUSSAO

A regeneração e/ ou reparo de feridas cutâneas ocorre numa série de eventos coordenados e sobrepostos denominados: a fase inflamatória aguda, a fase proliferativa e a fase de remodelação (PROFYRIS, TZIOTZIOS, e DO VALE., 2012).

No presente estudo, a fase inflamatória desenvolveu-se durante os primeiros três dias como observado na avaliação histológica. Essa fase visa conter a lesão e prevenir a infecção. A lesão causa a perda de células, ruptura de vasos sanguíneos com extravasamento dos constituintes sanguíneos e infiltração de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos e macrófagos, e fornece uma matriz extracelular (ECM) provisória para a migração dos queratinócitos (HATTORI *et al.*, 2009).

Na avaliação das imagens fotográficas no primeiro dia, observou-se um índice menor de lesão nos grupos ST, CB+ST e CN. Este índice menor obteve diferença estatisticamente significativa em comparação aos grupos C e CB, nos quais não aconteceu o fechamento primário da lesão. A “cola” e os estratos das plantas que a constituem, apresentaram resultados similares ao grupo controle, e não se obtiveram diferenças significantes entre os grupos. Adicionalmente, na avaliação histológica, evidenciou-se um material amorfo, de características eosinófilas, em ambos os lados da lesão incisional criada no dorso dos ratos. Este material apresentava uma diminuição da substância fundamental, desorganização das fibras colágenas e infiltrado inflamatório. CROFT e TARIN (1969), TARIN e CROFT (1970) observaram igualmente em lesões no dorso de ratos uma área eosinófila que identificaram como crosta, formada esta por tecido conjuntivo recoberto por um epitélio, que incluía leucócitos polimorfonucleares (PMNs), hemácias, plaquetas, fibrina e colágeno. Acrescenta-se que no primeiro dia do pós-operatório GAL *et al* (2006) observaram a área das margens epidérmicas espessadas como resultado da atividade mitótica das células basais. No presente estudo examinou-se com frequência atividade mitótica nas áreas próximas à lesão, mas esta não pode ser identificada especificamente nas células basais das margens epidérmicas. Esta atividade mitótica pode ser devida ao fenômeno de reepitelização, que envolve a proliferação aumentada de queratinócitos localizados adjacentes as células que migravam, o que assegura um fornecimento adequado de células para migração e cobrimento da lesão (HUO *et al.*, 2010).

Em concordância com as observações de CROFT e TARIN (1969), TARIN e CROFT (1970) e GAL *et al* (2006), os PMNs nos primeiros dias formaram uma faixa que separou a área da derme



da crosta anteriormente mencionada. Identificou-se após o terceiro dia que o infiltrado de PMN começava ser substituído por um mononuclear nos grupos CB, ST, CB+ST e CN, caracterizando a mudança entre as fases aguda e proliferativa da inflamação (GAL *et al.*, 2006). Todavia, os macrófagos se mantiveram presentes durante os dez dias de análise, denotando o papel fundamental que têm estas células no processo de reparo (DELAVERY *et al.*, 2011). Nos grupos restantes, no terceiro dia pós-operatório, a fase inflamatória aguda permanecia com sua máxima expressão, caracterizando a formação de uma rede de fibrina contendo muitas hemácias e células PMNs. Em contrapartida, no estudo de CROFT e TARIN (1969), no qual as lesões cicatrizaram por segunda intenção, entre as 40 e as 64 pós-operatórias horas foi possível observar a mudança do infiltrado PMN para o mononuclear. Esta diferença pode ser devida às dimensões diminuídas (comprimento e espessura) das incisões por eles realizadas, em relação comparação à metodologia utilizada no presente estudo.

Na continuação dos eventos que acontecem na regeneração e/ ou reparo de feridas cutâneas, a fase proliferativa inicia-se no primeiro dia após a lesão e alcança o pico entre os cinco e seis dias do pós-operatório (VIDISNKY *et al.*, 2006). Esta fase é caracterizada pela formação de tecido de granulação, fenômeno de reepitelização e angiogênese (HATTORI *et al.*, 2009). A regeneração da epiderme ocorre através de um processo denominado reepitelização. Abordar-se-a o estudo deste fenômeno em dois aspectos, análises macroscópica e análise microscópica. Macroscopicamente, pode-se considerar uma ferida reepitelizada quando uma camada de epitélio cobre o leito eritematoso do tecido de granulação. Considerando tal definição, pode-se afirmar que, macroscopicamente os grupos CB, CN, CB+ST e ST apresentaram os melhores resultados em relação à área reepitelizada. Concordando com outros autores o resultado estético alcançado com os CNs é similar ao obtido com a ST (QUINN 1997,1998; PACHULSKI *et al.*, 2005), além de ser uma técnica mais rápida e simples (SINGER *et al.*, 2008; MATIN, 2003; PELISSIER *et al.*, 2001). Em relação a mucosa queratinizada GIRAY *et al.* (1997), relataram que o uso do NBCA utilizado para o fechamento de retalhos mucoperiostais na região dos incisivos centrais gera, inclusive uma melhor

aparência estética nos terceiro e sétimo dias do pós-operatório em comparação com o material de sutura. Afora disso, após 21 dias de análise observacional, a cicatriz foi menor que quando utilizado o método de fixação mecânica. O material para o fechamento do retalho utilizado no estudo acima descrito foi a seda, sutura de origem natural não reabsorvível, com conhecido potencial para promover maior reação inflamatória maior e um acúmulo de biofilme (MINOZZI *et al.*, 2009). O material de sutura utilizado no presente estudo, foi o Nylon (Shalon, GO, Brasil), um material sintético, monofilamento não absorvível, feito de uma fibra de poliamida polimérica quimicamente inerte, que tem uma baixa reatividade tecidual (MINOZZI *et al.*, 2009). Na análise visual das imagens verificou-se melhor aparência estética com a utilização do CN no décimo dia, embora sem diferença estatisticamente significantes.

Em contrapartida aos excelentes resultados anteriormente expostos, no estudo de MUGLALI *et al.* (2011), os autores observaram uma maior reação inflamatória no fechamento de incisões na mucosa bucal de ratos quando utilizado o NBCA após 2, 7 e 14 dias em comparação à sutura. Clinicamente, estas incisões cicatrizaram por segunda intenção. No presente estudo foi evidenciado, na análise das imagens das amostras do terceiro dia do pós-operatório evidenciou-se uma deiscência da área cirúrgica com a utilização do CN. Isto pode explicar que a CB tenha mostrado níveis de índice de lesão ligeiramente menores nesse tempo experimental, porém não se pode excluir a possibilidade de que os extratos das plantas tenham contribuído para este resultado. Alguns autores sugerem que o NBCA fornece uma união mais forte, porém mais rígida quando comparado com o Octil-2-cianoacrilato (OCA), cianoacrilato com oito carbonos em sua cadeia lateral, que proporciona união mais fraca porém mais flexível (SINGER *et al.*, 2008). Permanece controverso se o CN é uma alternativa para as suturas quando utilizado nas proximidades de mucosas ou se a exposição frequente a umidade pode resultar na falha adesiva (SINGER *et al.*, 2008; MUGLALI *et al.*, 2011), embora exista extensa e segura utilização do CN em outras áreas da medicina, nas quais a umidade é característica. Exemplificando-se, o CN é utilizado no reparo laparoscópico de hérnias inguinais (LOSI *et al.*, 2010; KUKLETA 2011), tratamento e profilaxia de varizes gástricas



(KANG et al., 2011) e como agente hemostático (AL-BELASY e AMER, 2003).

Na análise microscópica o fenômeno da reepitelização envolve vários processos, incluindo a formação de uma matriz provisória, a migração dos queratinócitos a partir das margens da lesão, a proliferação de queratinócitos que sustentam a migração epitelial, a estratificação e diferenciação do novo epitélio e o reparo da área da membrana basal (O'TOOLE, 2001). Os queratinócitos migram a partir das margens da lesão e de células-tronco epiteliais derivadas do folículo piloso e glândulas sudoríparas (WONG *et al.*, 2012). Este processo é ativado por vias de sinalização celular procedentes das margens da lesão que liberam diferentes citocinas e fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) (MARTIN, 1997). O EGF facilita a regeneração de células epidérmicas mediante a estimulação da proliferação e migração dos queratinócitos, estando implicado também na migração de fibroblastos e na formação do tecido de granulação (HARDWICKE *et al.*, 2008).

Após 24-48 horas a migração acontece entre a banda dos leucócitos PMNs e o tecido conjuntivo. As células epiteliais migram ao longo da margem da derme e avançam sobre o tecido de granulação rico em fibronectina (O'TOOLE, 2001; GAL *et al.*, 2006). Os queratinócitos migrantes separam o tecido de granulação recém formado do coágulo de fibrina, até o seu completo isolamento. Isto se deve, provavelmente, à anti-adesividade do fibrinogênio e da fibrina para os queratinócitos. Os queratinócitos em cultura não expressam receptores funcionais para fibrinogênio / fibrina em contraste com às células endoteliais e fibroblastos. O TGF-1 induz a adesão dos queratinócitos à fibronectina, mas não à fibrina ou fibrinogênio (KUBO *et al.*, 2001).

Neste estudo, identificou-se a migração epitelial no terceiro dia após a lesão. Segundo as observações de CROFT e TARIN (1969), 16 horas após a lesão já foi possível identificar áreas de reepitelização, e observaram com afrouxamento das ligações intercelulares e do contato com a membrana basal. Em

contrapartida, KUBO *et al.*, (2001) identificaram a migração epitelial com dia 5 do pós-operatório, porém os defeitos por eles criados consistiam em feridas excisionais de 8 mm de diâmetro e de espessura total, na pele de porcos.

As células epidérmicas parecem seguir um padrão de movimento, por rolamento ou deslizamento, uma sobre a outra (KRAWCZYK, 1971). ODLAND e ROSS (1968) examinaram a morfologia das células epiteliais mediante microscopia eletrônica no momento do início da migração. Observaram que os queratinócitos mudam drasticamente sua forma à medida que avançam, tornando-se morfologicamente planos e alongados. Os filamentos de queratina retraem-se da periferia citoplásmica e há uma redistribuição do citoesqueleto de actina em lamelipódios (ODLAND e ROSS, 1968). CROFT e TARIN (1969) observaram no microscópio eletrônico que as células da derme em contato com o epitélio possuíam as características associadas com uma síntese ativa de proteínas (nucléolo proeminente e um abundante retículo endoplasmático rugoso). Foi identificado um contato íntimo entre as células epiteliais e dérmicas na região que cessou a invasão epitelial, e observaram-se lamelipódios provenientes das células epiteliais. Segundo os autores, este acontecimento é, possivelmente, um fator importante para o controle da migração e para o estabelecimento da diferenciação epitelial e formação dos estratos da epiderme.

O último evento da regeneração e/ ou reparo de feridas cutâneas é a fase de maturação e remodelação, o início desta fase foi observado aos sete dias após a lesão. A fase de remodelação é o processo de re-organização da matriz extracelular em torno do local da lesão, na qual os miofibroblastos (MFBs), fibroblastos diferenciados que tem características ultra estruturais de células musculares lisas (ROBINS, 2005), desempenham um papel fundamental na contração da ferida e síntese controlada e degradação de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágeno, conduzindo a um aumento da resistência da ferida (HATTORI *et al.*, 2009; SARRAZY *et al.*, 2011).

Na avaliação histológica evidenciou-se a completa regeneração da epiderme no sétimo dia após a lesão em todos



os grupos estudados. No estudo de VIDISNKY *et al.* (2006), a regeneração da epiderme foi identificada cinco dias após a cirurgia. Em função de não ter sido analisado este período é possível que no quinto dia a epiderme estivesse igualmente regenerada. No décimo dia de avaliação, o epitélio ainda encontrava-se espessado em relação às áreas mais afastadas da lesão nos grupos CB+ST, RJ, VH, LA, BB e C. A organização dos estratos epidérmicos foi observada exclusivamente no grupos CN, ST e CB. A avaliação histológica no sétimo dia mostrou que todos os grupos apresentaram tecido de granulação na derme, rico em fibrina e vasos sanguíneos. Identificou-se a presença de fibroblastos, feixes de fibras colágenas e infiltrado inflamatório principalmente mononuclear, porém não muito intenso. Resultados similares apresentaram ELVIN *et al.* (2009) quando avaliaram, mediante análise histológica, o reparo após uma semana de um adesivo experimental à base de fibrinogênio, um adesivo de fibrina comercial (TisseelTM Duo 500, Baxter Healthcare, Toongabbie, NSW) e os grampos no fechamento de feridas incisionais em pele de ratos. No presente estudo as alterações na derme reticular quando utilizado o CN e a ST, são menos visíveis ou visíveis numa área menor em relação aos demais grupos, similar aos resultados de ELVIN *et al.* (2009) quando utilizaram o adesivo de fibrina comercial. A CB, neste estudo apresentou uma área de tecido de granulação maior comparável ao grupo C, com alterações histológicas similares ao adesivo experimental e os grampos no estudo de ELVIN *et al.* (2009).

Em função de não ter (em) sido utilizado (s) marcador (es) específico (s) para MFBs não foi possível quantificar sua presença nem diferenciar sua maior ou menor expressão nos diferentes grupos. Porém, foram observadas células morfológicamente diferentes aos fibroblastos, em estreita relação com estes, na fase de remodelação. Em tecidos conjuntivos *in vivo*, os MFBs são morfológica e funcionalmente diferentes dos fibroblastos, esta morfologia diferenciada é devida ao desenvolvimento de fibras de estresse e adesões focais características (TOMASEK *et al.*, 2002). Concordando com ROBINS (2005), o aspecto que mais diferencia a cicatrização primária da secundária é o processo de contração da ferida dependente dos MFBs. Acredita-se que estas células estão

presentes em maior número nos grupos nos quais a cicatrização secundária foi representativa, pois é o estresse mecânico que induz os fibroblastos a se tornarem proto-miofibroblastos e, posteriormente, MFBs (HINZ et al., 2001b). O termo proto-miofibroblastos tem sido proposto para diferenciar tais fibroblastos ativados dos quiescentes, que carecem de aparelho contrátil na maioria dos tecidos intactos. Esta primeira mudança fenotípica ocorre em resposta a mudanças na composição, organização e propriedades mecânicas da matriz extracelular (ECM) (TOMASEK et al., 2002) e de citocinas localmente liberadas pelas células inflamatórias e residentes (WERNER e GROSE, 2003). Com o aumento da tensão na ECM resultante da sua própria atividade de remodelação, os proto-miofibroblastos se diferenciam em MFBs expressando α -SMA, o marcador de MFBs mais amplamente utilizado. A expressão de α -SMA é controlada pela ação conjunta de fatores de crescimento como o (TGF- β 1), de proteínas especializadas da ECM como a fibronectina, e do microambiente mecânico.

Este estudo apresenta limitações, primeiramente observou-se uma grande transição no reparo e regeneração em todos os grupos no intervalo de três a sete dias, provavelmente a análise em cinco dias poderia ter proporcionado mais detalhes especialmente quanto ao processo de reepitelização. É difícil extrapolar os resultados para a mucosa oral, em função da constante humidade encontrada nesta. Estudos posteriores são necessários para esclarecer esses aspectos.

Conclui-se que a “cola biológica”, quando avaliada macroscopicamente no primeiro dia não apresentou propriedades adequadas para manter as bordas da lesão unidas em nenhuma das amostras avaliadas, em relação ao cianocrilato e a sutura, e o índice de lesão maior na “cola” foi estatisticamente significativo. Foi observada uma rápida evolução na cicatrização com o passar dos dias, sendo o aspecto macroscópico comparável com o grupo ST ao sétimo dia, porém este resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Os efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos descritos na literatura para os derivados das plantas contidas na CB não ficaram evidenciados no presente estudo. Porém, inicialmente esse estudo foi



desenhado para avaliar a adesividade da “cola biológica”. Os extratos das plantas não foram aplicados terapeuticamente, e sim exclusivamente no dia da lesão, por tanto é possível afirmar categoricamente o quanto estes poderiam ter auxiliado no processo inflamatório. Além disso, o modelo de estudo mais apropriado para avaliar a influência de agentes externos na cicatrização é o modelo excisional e não o incisional aqui utilizado. A sutura continua sendo a técnica de eleição para a aproximação das bordas, porém sugere-se a utilização alternativa do cianocrilato, em função dos excelentes resultados obtidos, comparáveis à sutura.

Adita-se que a sutura na prática odontológica não é simplesmente um método de aproximação das bordas da incisão, sua utilização na periodontia/implantodontia, se estende à manipulação tecidual. Atualmente só os métodos mecânicos são utilizados para tal objetivo, mas a aplicação de métodos adesivos pode apresentar vantagens, tais como diminuição do tempo cirúrgico, obtenção de resultados estéticos similares ou superiores, potencial hemostático e cicatricial. Essas propriedades sugerem a possibilidade de ampliar as indicações desses materiais, por exemplo na utilização do rompimento da artéria palatina pela retirada um enxerto de conjuntivo do palato e/ou como substituto ao cimento cirúrgico na área doadora de enxerto epitélio/conjuntivo que tanto desconforto causam no paciente.



REFERENCIAS

AL-BELASY, F.A; AMER, M.Z. Hemostatic effect of n-butyl-2-cyanoacrylate (histoacryl) glue in warfarin-treated patients undergoing oral surgery. **J Oral Maxillofac Surg.** v.61, n.12, p.1405-9. 2003

AMIEL, G.E. et al. Use of N-butyl-2-cyanoacrylate in elective surgical incisions-longterm outcomes. **J Am Coll Surg.** v.189, n.1,p.21-5. 1999

BHATNAGAR, P.K. et al. Anti-tumor effects of the bacterium *Caulobacter crescentus* in murine tumor models. **Cancer Biol Ther.** v.5, n.5, p.485-91. 2006

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.; DE ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology.** v.131, p.326–342. 2010

CHIBBARO, S; TACCONI, L. Use of skin glue versus traditional wound closure methods in brain surgery: A prospective, randomized, controlled study. **J Clin Neurosci.** v.16, n.4, p.535-9. 2009

CROFT CB, TARIN D. Ultrastructural studies of wound healing in mouse skin. I. Epithelial behaviour. **J Anat.** 1970 Jan;106 :63-77.

DELAVARY BM. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology.** Jul;216(7):753-62. 2011

ELVIN CM. et al. Evaluation of photo-crosslinked fibrinogen as a rapid and strong tissue adhesive. **J Biomed Mater Res A.** May;93(2):687-95. 2010

GÁL P. et al. Early changes in the tensile strength and morphology of primary sutured skin wounds in rats. **Folia Biol (Praha).** 52(4):109-15. 2006

GIRAY, CB. et al. Clinical and electron microscope comparison of silk sutures and n-butyl-2-cyanoacrylate in human mucosa. **Aust Dent J** v.42(4), p.255-8. 1997

HARDWICKE J. et al. Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives. **Surgeon.** Jun;6(3):172-7. 2008

HATTORI N. et al. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. **Am J Pathol.** Aug;175(2):533-46. 2009.

HINZ B. et al. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **Am J Pathol.** Sep;159(3):1009-20. 2001

HUO R. et al. Noninvasive electromagnetic fields on keratinocyte growth and migration. **J Surg Res.** Aug;162(2):299-307. 2010

KANG, EJ. et al. Long-term result of endoscopic Histoacryl (N-butyl-2-cyanoacrylate) injection for treatment of gastric varices. **World J Gastroenterol** v. 21;17(11), p.1494-500. 2011

KJAERGARD, HK. Suture support: Is it advantageous? **The American Journal of Surgery** v.182, p.15–20. 2001

KRAWCZYK WS. A pattern of epidermal cell migration during wound healing. **J Cell Biol.** 1971 May 1;49(2):247-63.

KUBO M. et al. Fibrinogen and fibrin are anti-adhesive for keratinocytes: a mechanism for fibrin eschar slough during wound repair. **J Invest Dermatol.** Dec;117(6):1369-81. 2001

LOSI, P. et al. Cyanoacrylate surgical glue as an alternative to suture threads for mesh fixation in hernia repair. **J Surg Res** v.163(2), p.53-8. 2010

MARTIN P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science.** Apr 4;276:75-81. 1997

MATIN, SF. Prospective randomized trial of skin adhesive versus sutures for closure of 217 laparoscopic port-site incisions. **J Am Coll Surg.** v.196(6), p.845-53. 2003

MINOZZI, F. et al. The sutures in dentistry. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v.13(3), p.217-26. 2009



MUGLALI, M. et al. Immunohistochemical comparison of indermil with traditional suture materials in dental surgery. **J Craniofac Surg.** v.22(5), p.1875-9. 2011

ODLAND G, ROSS R. Human wound repair. I. Epidermal regeneration. **J Cell Biol.** 1968 Oct;39(1):135-51.

OLIVEIRA FA. et al. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research** 49. 105–111. 2004

O'TOOLE EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. **Clin Exp Dermatol.** Sep;26 (6):525-30. 2001

PACHULSKI R. et al. Cardiac device implant wound closure with 2-octyl cyanoacrylate. **J Interv Cardiol.** Jun;18(3):185-7. 2005

PELISSIER P. et al. Internal use of n-butyl 2-cyanoacrylate (Indermil) for wound closure: an experimental study. **Plast Reconstr Surg.** Nov;108(6):1661-6. 2001

PROFYRIS C, TZIOTZIOS C, DO VALE I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. **J Am Acad Dermatol.** Jan;66(1):1-10; 2012

QUINN J. et al. Octylcyanoacrylate tissue adhesive versus suture wound repair in a contaminated wound model. **Surgery.** Jul;122(1):69-72. 1997

QUINN JV. et al. N-2-butylcyanoacrylate: risk of bacterial contamination with an appraisal of its antimicrobial effects. **J Emerg med.** jul-aug;13(4):581-5. 1995

ROBBINS e COTRAN. Patologia- Bases patológicas das doenças. 7ª edição. Elsevier editora Ltda, 2005

SARRAZY V. et al. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments. **Wound Repair Regen.** Sep;19 Suppl 1:s10-5. 2011

SIANI AC. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology** 66. 57–69. 1999

SINGER AJ, PERRY LC, ALLEN RL JR. In vivo study of wound bursting strength and compliance of topical skin adhesives. **Acad Emerg Med**. Dec;15(12):1290-4. 2008b.

SOBIERANSKI A.C., MANTELLI S.L., COSER L., COMUNELLO E., VON WANGENHEIM A., CARGNIN-FERREIRA E., DI GIUNTA G. *Learning a Nonlinear Color Distance Metric for the Identification of Skin Immunohistochemical Staining*. In: IEEE 22nd CBMS 2009- International Symposium on Computer-Based Medical Systems, Albuquerque / NM / EUA.

STERNBERG K. et al. Development of a biodegradable tissue adhesive based on functionalized 1,2-ethylene glycol bis(dilactic acid). I. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. Aug;94(2):318-26. 2010

TARIN D, CROFT CB. Ultrastructural studies of wound healing in mouse skin. II. Dermo-epidermal interrelationships. **J Anat**. Jan;106(Pt 1):79-91. 1970

TOMASEK JJ et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**. May;3(5):349-63. 2002

TSANG PH. et al. Adhesion of single bacterial cells in the micronewton range. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Apr 11;103(15):5764-8. 2006

VIDINSKÝ B. et al. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats. **Acta Vet. Brno**. 75: 197-202, 2006

WERNER S, GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev**. Jul;83(3):835-70. 2003

WONG VW. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **Int J Biomater**. Article ID 926059. 2012



Figuras

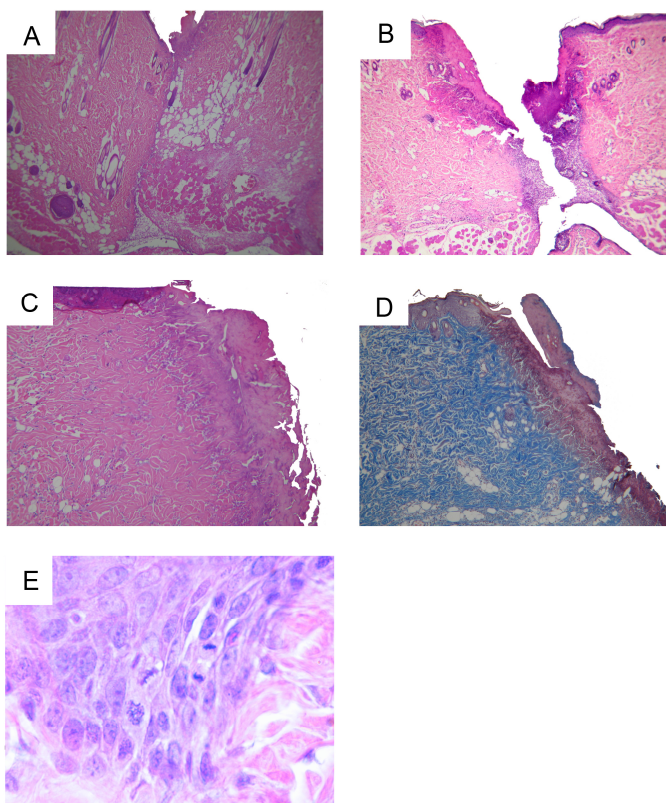


Figura 1. Cortes Histológico mostrando o primeiro dia do pós-operatório. **A.** Neste período foi possível identificar no grupo ST continuidade da derme devido à aproximação das margens da lesão com esta técnica; **B.** A área da lesão foi evidente nos demais grupos pela ausência da continuidade da epiderme e da derme; **C, D.** Em todos os grupos, ambos os lados da lesão, apresentaram uma crosta formada por um material amorfo, de características eosinófilas, contendo restos de tecido epitelial, material coagulado, células necróticas e infiltrado inflamatório. **E.** Examinou-se atividade mitótica nas áreas próximas à lesão.

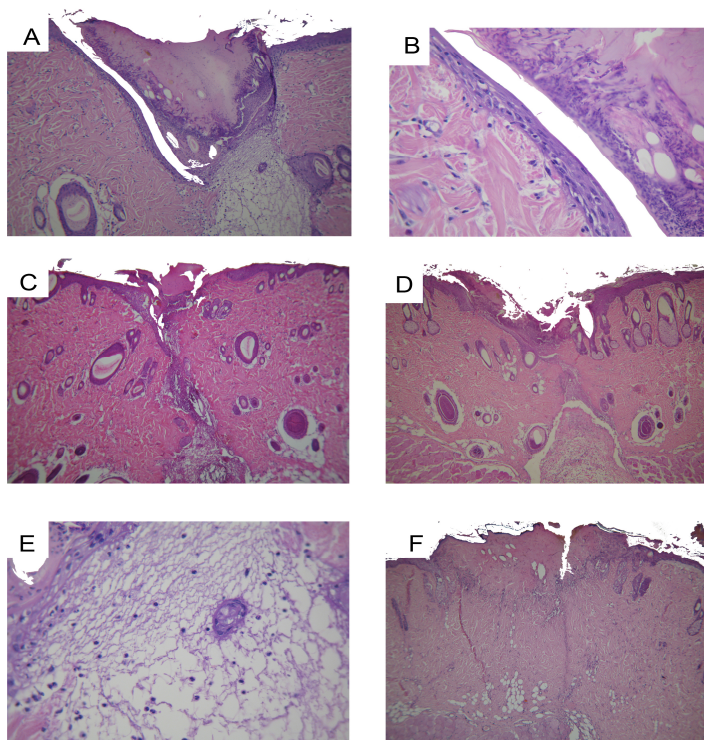


Figura 2. Cortes Histológico mostrando o terceiro dia do pós-operatório. **A.** Neste período ainda foi possível observar em todos os grupos a presença da crosta contendo um grande número de PMNs e interposta entre as margens da lesão; **B.** Entre essas margens e a crosta evidenciou-se uma faixa de queratinócitos; **C.** Nos grupos CB, ST, CN, a derme apresentou-se parcialmente revestida por células de natureza epitelial; **D.** Entretanto, nos grupos RJ, BB, LA e CB+ST não foi possível observar esse revestimento e a lesão no nível da derme estava preenchida pela rede de fibrina contendo muitas hemácias e células PMNs. **E.** A derme reticular nas proximidades da lesão apresentou uma densidade menor dos feixes das fibras colágenas. A rede de fibrina ocupava uma área mais extensa nos grupos RJ, BB, LA, CB+ST, VH e C; **F.** No grupo CB+ST, embora as margens epiteliais encontravam-se separadas pela crosta, a derme encontrava-se em perfeita continuidade, sem resquícios da área de fibrina, exceto por uma pequena faixa que indica o local da incisão.

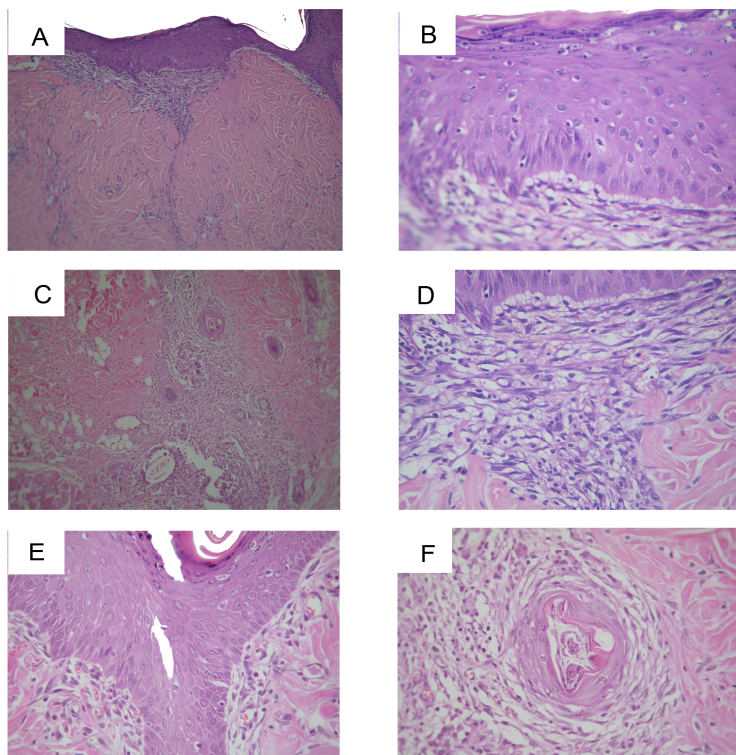


Figura 3. Cortes Histológico mostrando o sétimo dia do pós-operatório. **A, B.** Todos os grupos mostravam a epiderme regenerada contendo todos os estratos diferenciados, com destaque para o estrato espinhoso que possui um aspeto mais espessado quando comparado com o epitélio mais afastado da lesão. Na derme reticular, a área de tecido de granulação estava mais reduzida nos grupos ST e CB+ST; **C,D.** Em relação à derme existia a presença de tecido de granulação, em franco processo de diferenciação onde já podiam ser observados fibroblastos, miofibroblastos e, vasos sanguíneos com morfologias características; **E.** Em todos os grupos a derme papilar ainda apresentava tecido de granulação com infiltrado leucocitário; **F.** Observou-se reações granulomatosas à corpo estranho na derme reticular.

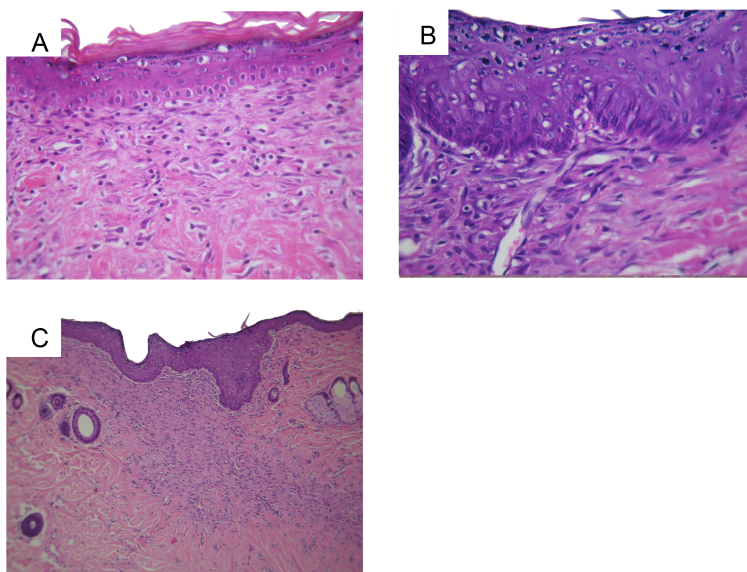


Figura 4. Cortes Histológico mostrando o décimo dia do pós-operatório. **A.** Observou-se neste período continuidade epitelial ao longo de toda a superfície (reepitelização); **B.** O epitélio ainda encontrava-se espessado nos grupos CB+ST, RJ, VH, LA, BB e C; **C.** A área cicatricial apresentava-se maior e mais celularizada nos grupos LA, VH, RJ, BB.

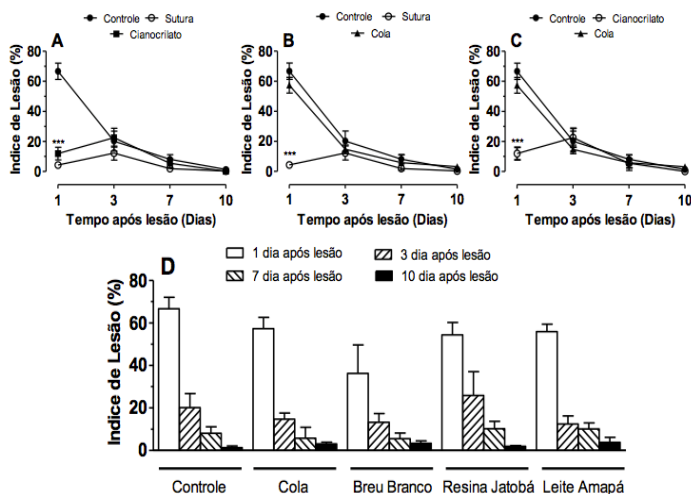


Figura 5. Avaliação do índice de lesão pós-operatória nos grupos Controle, Sutura, Cola biológica, Cianocrilato, nos tempos de 1, 3, 7 e 10 dias. Valores representados pelas medias de quatro animais por grupo; linhas verticais indicando o desvio padrão. **(A)** Os níveis de índice de lesão apresentaram diferença no primeiro dia entre os grupos Controle e sutura, controle e cianocrilato, *** $p < 0,05$. Nos demais períodos foram equivalentes. **(B)** Os níveis de índice de lesão apresentaram diferença no primeiro dia entre os grupos cola e sutura, *** $p < 0,05$. Nos demais períodos foram equivalentes **(C)** Os níveis de índice de lesão apresentaram diferença no primeiro dia entre os grupos cola e cianocrilato, *** $p < 0,05$. Os demais tempos foram equivalentes **(D)** Sem diferenças significantes entre os grupos.

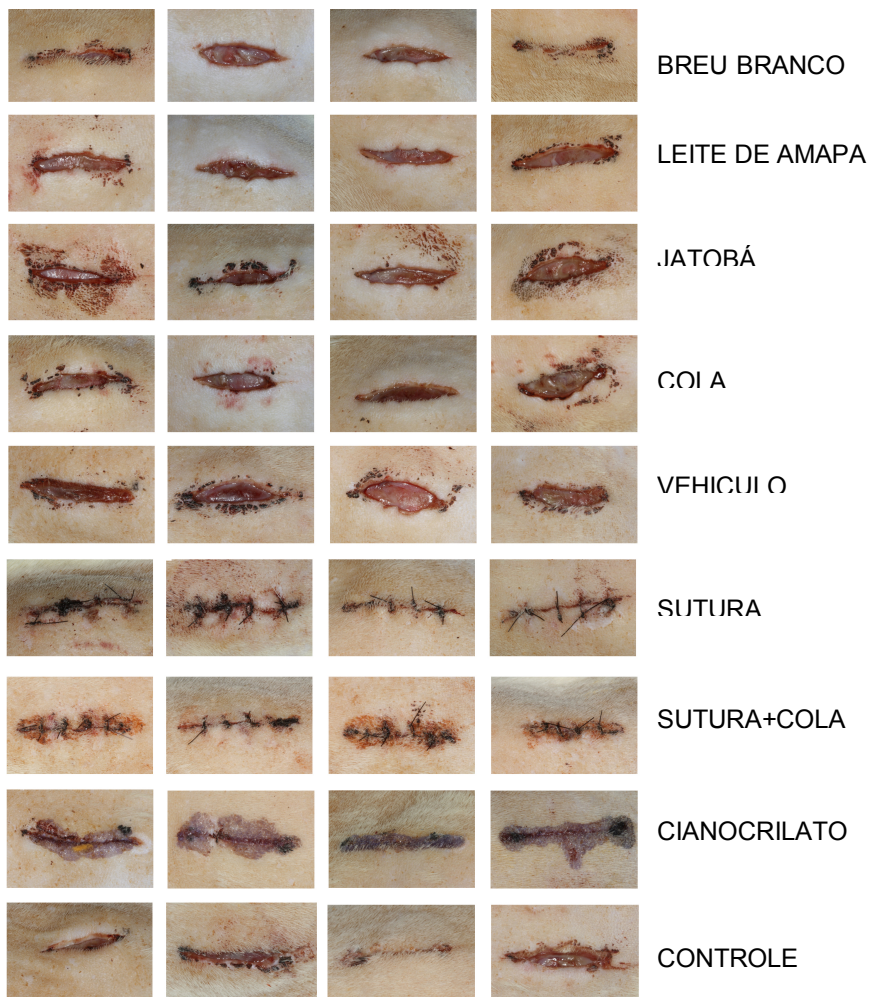


Figura 6. Imagens mostrando o primeiro dia do pós-operatório

2



Figura 7. Imagens mostrando o terceiro dia do pós-operatório

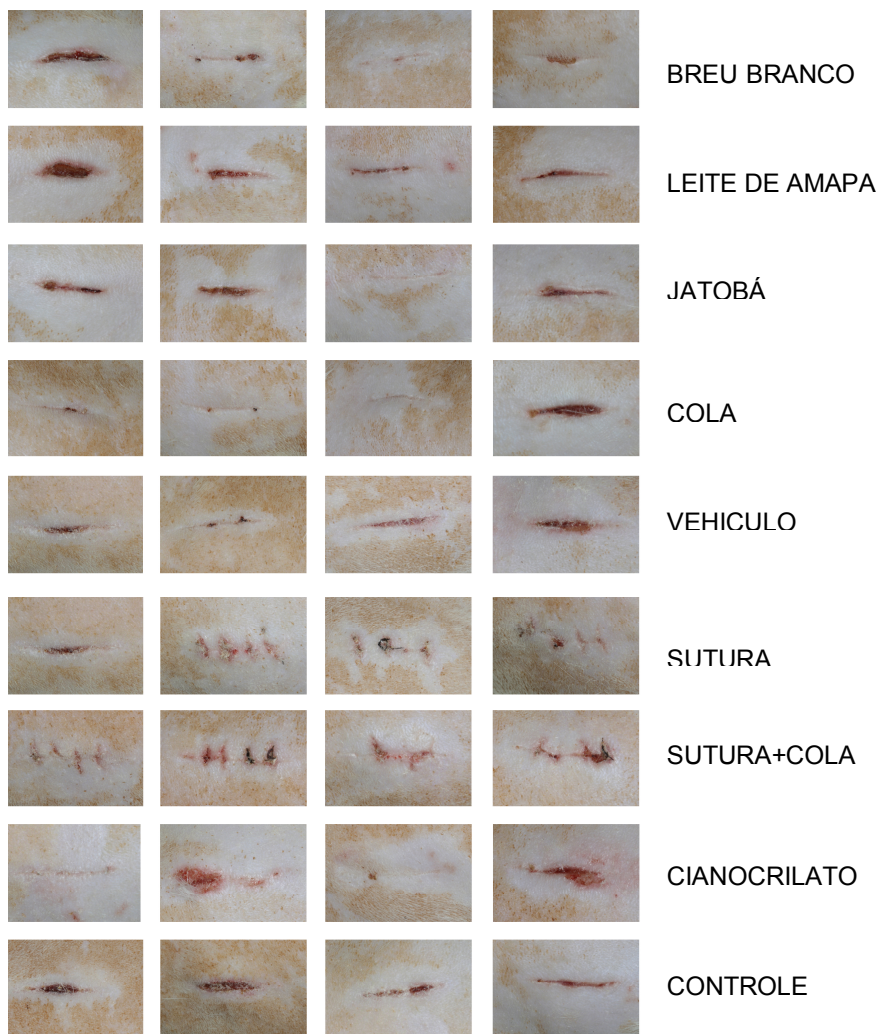


Figura 8. Imagens mostrando o sétimo dia do pós-operatório

2

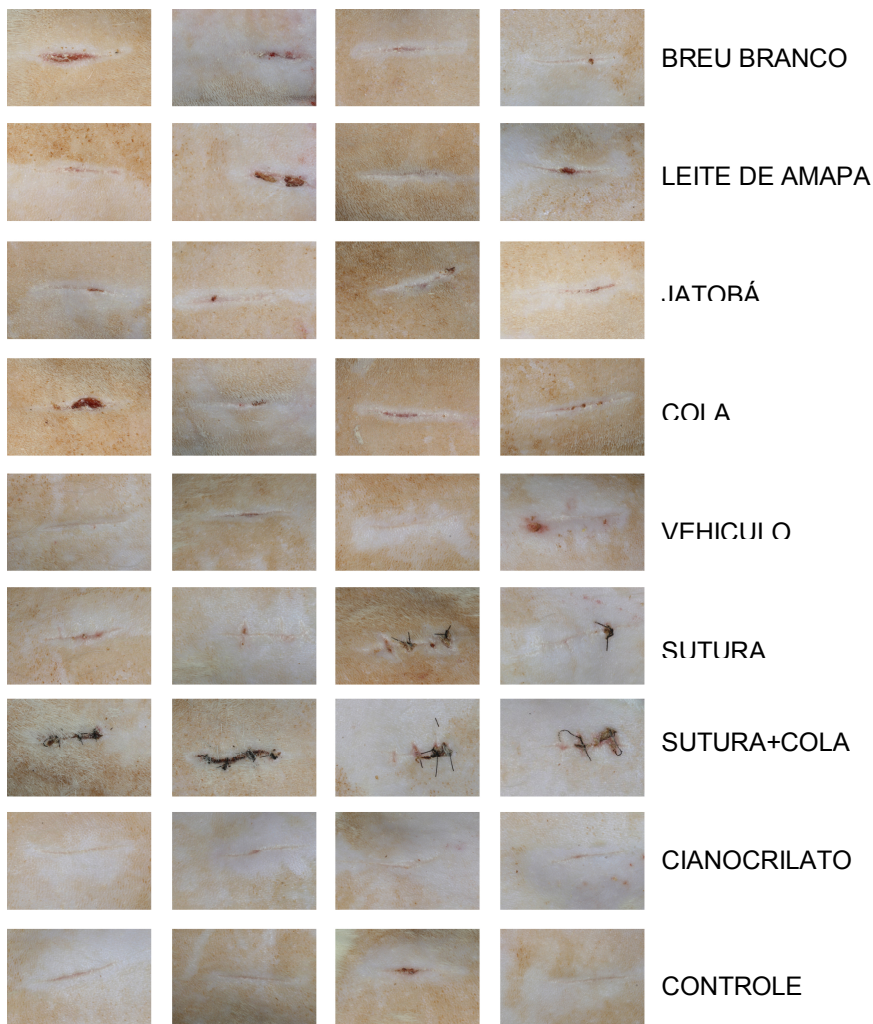


Figura 9. Imagens mostrando o décimo dia do pós-operatório



BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ABDEL-KADER, M. et al. Isolation and absolute configuration of ent-Halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **J Nat Prod**, v.65, n.1, p.11-5, 2002.

AGUIAR, J.C. et al. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Nat Prod Commun**, v.5, n.12, p.1977-80, 2010.

AL-BELASY, F.A; AMER, M.Z. Hemostatic effect of n-butyl-2-cyanoacrylate (histoacryl) glue in warfarin-treated patients undergoing oral surgery. **J Oral Maxillofac Surg**. v.61, n.12, p.1405-9. 2003

AMIEL, G.E. et al. Use of N-butyl-2-cyanoacrylate in elective surgical incisions-longterm outcomes. **J Am Coll Surg**. v.189, n.1,p.21-5. 1999

ARNOUX V. et al. Rise and Fall of Epithelial Phenotype: Concepts of Epithelial-Mesenchymal Transition. Springer, 2005

BHATNAGAR, P.K. et al. Anti-tumor effects of the bacterium *Caulobacter crescentus* in murine tumor models. **Cancer Biol Ther**. v.5, n.5, p.485-91. 2006

BODENMILLER, D; TOH, E; BRUN, Y.V. Development of surface adhesion in *Caulobacter crescentus*. **J Bacteriol**. v.186, n.5, p.1438-47. 2004

BUCKERIDGE, M.S. et al. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydr Res**. v. 303, n.2, p. 233-7. 1997

BRUNS, T.B. et al. A new tissue adhesive for laceration repair in children. **J Pediatr**. v.132, n.6, p.1067-70. 1998

CALIXTO, J.B.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor k B (NF-kB). **Planta Med** v.69, p.973-983. 2003

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.; DE ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.131, p.326–342. 2010

CHIBBARO, S; TACCONI, L. Use of skin glue versus traditional wound closure methods in brain surgery: A prospective, randomized, controlled study. **J Clin Neurosci**. v.16, n.4, p.535-9. 2009

COUGHLIN, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **J Thromb Haemost**. v.3, n.8, p.1800-14. 2005

CROFT CB, TARIN D. Ultrastructural studies of wound healing in mouse skin. I. Epithelial behaviour. **J Anat**. 1970 Jan;106 :63-77.

DELAVERY BM. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**. Jul;216(7):753-62. 2011

DOMSALLA, A; MELZIG, M.F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med** v.74, n.7, p.699-711. 2008

DO ROSÁRIO, M.M. et al. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. **Chem Biol Interact**. 15;189(1-2), p.127-33. 2011

ELVIN CM. et al. Evaluation of photo-crosslinked fibrinogen as a rapid and strong tissue adhesive. **J Biomed Mater Res A**. May;93(2):687-95. 2010

FDA approval order for Histoacryl® and Histoacryl® Blue Topical Skin Adhesive. Available at:
http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf5/p050013a.pdf.
 Accessed january 16, 2012

GÁL P. et al. Early changes in the tensile strength and morphology of primary sutured skin wounds in rats. **Folia Biol (Praha)**. 52(4):109-15. 2006



GENNARI, R. et al. A prospective, randomized, controlled clinical trial of tissue adhesive (2-octylcyanoacrylate) versus standard wound closure in breast surgery. **Surgery**. v.136(3), p.593-9. 2004

GIRAY, CB. et al. Clinical and electron microscope comparison of silk sutures and n-butyl-2-cyanoacrylate in human mucosa. **Aust Dent J** v.42(4), p.255-8. 1997

GREENE, D; KOCH, RJ; GOODE, RL. Efficacy of octyl-2-cyanoacrylate tissue glue in blepharoplasty. A prospective controlled study of wound-healing characteristics. **Arch Facial Plast Surg**.v.1(4), p.292-6. 1999

HARVEY AL. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today** Volume 13, Numbers 19/20 October 2008

HARDWICKE J. et al. Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives. **Surgeon**. Jun;6(3):172-7. 2008

HATTORI N. et al. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. **Am J Pathol**. Aug;175(2):533-46. 2009.

HINZ B. et al. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **Am J Pathol**. Sep;159(3):1009-20. 2001

HOLANDA PINTO, SA. et al. Antinoceptive effect of triterpenoid a,b-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine** v.15, p.630–634. 2008

HUO R. et al. Noninvasive electromagnetic fields on keratinocyte growth and migration. **J Surg Res**. Aug;162(2):299-307. 2010

KANG, EJ. et al. Long-term result of endoscopic Histoacryl (N-butyl-2-cyanoacrylate) injection for treatment of gastric varices. **World J Gastroenterol** v. 21;17(11), p.1494-500. 2011

KJAERGARD, HK. Suture support: Is it advantageous? **The American Journal of Surgery** v.182, p.15–20. 2001

KRAWCZYK WS. A pattern of epidermal cell migration during wound healing. **J Cell Biol.** 1971 May 1;49(2):247-63.

KUBO M. et al. Fibrinogen and fibrin are anti-adhesive for keratinocytes: a mechanism for fibrin eschar slough during wound repair. **J Invest Dermatol.** Dec;117(6):1369-81. 2001

KUKLETA, JF; FREYTAG, C; WEBER, M. Efficiency and safety of mesh fixation in laparoscopic inguinal hernia repair using n-butyl cyanoacrylate: long-term biocompatibility in over 1,300 mesh fixations. **Hernia** v.21. 2011

LEGGAT PA, KEDJARUNE U, SMITH DR. Toxicity of cyanoacrylate adhesives and their occupational impacts for dental staff. **Ind Health.** 2004 Apr;42(2):207-11.

LEGGAT PA, SMITH DR, KEDJARUNE U. Surgical applications of cyanoacrylate adhesives: a review of toxicity. **ANZ J Surg.** Apr;77(4):209-13. 2007

LIMA, NN. et al. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Int J Biol Macromol.** v.17(6), p.413-5. 1995

LINARES HA. From wound to scar. **Burns** Vol. 32, N. 5, pp. 339-352. 1995.

LOSI, P. et al. Cyanoacrylate surgical glue as an alternative to suture threads for mesh fixation in hernia repair. **J Surg Res** v.163(2), p.53-8. 2010

MARTIN P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science.** Apr 4;276:75-81. 1997

MATIN, SF. Prospective randomized trial of skin adhesive versus sutures for closure of 217 laparoscopic port-site incisions. **J Am Coll Surg.** v.196(6), p.845-53. 2003

MINOZZI, F. et al. The sutures in dentistry. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v.13(3), p.217-26. 2009



MEDEIROS, R. et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology** v.559, p.227–235. 2007

MUGLALI, M. et al. Immunohistochemical comparison of indermil with traditional suture materials in dental surgery. **J Craniofac Surg.** v.22(5), p.1875-9. 2011

NOGUEIRA RT. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**. 2001 Dec;58(8):1153-7.

ODLAND G, ROSS R. Human wound repair. I. Epidermal regeneration. **J Cell Biol.** 1968 Oct;39(1):135-51.

OLIVEIRA FA. et al. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology** 98. 103–108. 2005

OLIVEIRA FA. et al. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research** 49. 105–111. 2004

O'TOOLE EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. **Clin Exp Dermatol.** Sep;26 (6):525-30. 2001

PACHULSKI R. et al. Cardiac device implant wound closure with 2-octyl cyanoacrylate. **J Interv Cardiol.** Jun;18(3):185-7. 2005

PALADINI RD. et al. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. **J Cell Biol.** Feb;132(3):381-97. 1996

PELISSIER P. et al. Internal use of n-butyl 2-cyanoacrylate (Indermil) for wound closure: an experimental study. **Plast Reconstr Surg.** Nov;108(6):1661-6. 2001

POINDEXTER, J. S. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiol. Rev.** 45:123-179. 1981

POINDEXTER, J.S. Biological properties and classification of the Caulobacter group. *Bacteriol. Rev.* 28:231-295. 1964

PROFYRIS C, TZIOTZIOS C, DO VALE I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. **J Am Acad Dermatol.** Jan;66(1):1-10; 2012

QUINN J. et al. Octylcyanoacrylate tissue adhesive versus suture wound repair in a contaminated wound model. **Surgery.** Jul;122(1):69-72. 1997

QUINN JV. et al. N-2-butylcyanoacrylate: risk of bacterial contamination with an appraisal of its antimicrobial effects. *J Emerg med.* jul-aug;13(4):581-5. 1995

ROBBINS e COTRAN. Patologia- Bases patológicas das doenças. 7ª edição. Elsevier editora Ltda, 2005

ROSS M.H, ROMRELL L.J. e KAYE G.I, 1995. Histology- A text and atlas. 3ª edição. Williams & Wilkins, 1995

SARRAZY V. et al. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments. **Wound Repair Regen.** Sep;19 Suppl 1:s10-5. 2011

SHAPIRO AJ, DINSMORE RC, NORTH JH JR. TENSILE strength of wound closure with cyanoacrylate glue. **Am Surg.** Nov;67(11):1113-5. 2001

SIANI AC. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology** 66. 57–69. 1999

SINGER AJ, PERRY LC, ALLEN RL JR. In vivo study of wound bursting strength and compliance of topical skin adhesives. **Acad Emerg Med.** Dec;15(12):1290-4. 2008b.



SOBIERANSKI A.C., MANTELLI S.L., COSER L., COMUNELLO E., VON WANGENHEIM A., CARGNIN-FERREIRA E., DI GIUNTA G. *Learning a Nonlinear Color Distance Metric for the Identification of Skin Immunohistochemical Staining*. In: IEEE 22nd CBMS 2009 - International Symposium on Computer-Based Medical Systems, Albuquerque / NM / EUA.

STERNBERG K. et al. Development of a biodegradable tissue adhesive based on functionalized 1,2-ethylene glycol bis(dilactic acid). I. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. Aug;94(2):318-26. 2010

SUSUNAGA GS, et al.. Triterpenes from the resin of Protium heptaphyllum. **Fitoterapia**. Aug;72(6):709-11. 2001

TARIN D, CROFT CB. Ultrastructural studies of wound healing in mouse skin. II. Dermo-epidermal interrelationships. **J Anat**. Jan;106(Pt 1):79-91. 1970

TESTINI M. et al. A single-surgeon randomized trial comparing sutures, N-butyl-2-cyanoacrylate and human fibrin glue for mesh fixation during primary inguinal hernia repair. **Can j surg**. jun;53(3):155-60. 2010

TOMASEK JJ et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**. May;3(5):349-63. 2002

TORIUMI DM. et al. Use of octyl-2-cyanoacrylate for skin closure in facial plastic surgery. **Plast Reconstr Surg**. Nov;102(6):2209-19. 1998

TSANG PH. et al. Adhesion of single bacterial cells in the micronewton range. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Apr 11;103(15):5764-8. 2006

VIDINSKY B. et al. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats. **Acta Vet. Brno**. 75: 197-202, 2006

WERNER S, GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev**. Jul;83(3):835-70. 2003

WONG VW. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **Int J Biomater**. Article ID 926059. 2012



APÊNDICE A- Metodologia expandida

Considerações éticas

Este projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para obtenção de parecer favorável à sua execução sob o número PP00799.

A necessidade do uso dos animais nesse protocolo foi imprescindível para que fossem mantidas as condições endógenas sistêmicas intactas para a avaliação de reação inflamatória e regeneração tecidual. Somente após serem identificados os mecanismos básicos da fisiopatologia da inflamação e da regeneração tecidual em animais de laboratório, torna-se possível o estudo de outras espécies em seu habitat natural e seres humanos, ressaltando-se o fato de que haverá maior variabilidade de resposta à inflamação e ao reparo.

A escolha do rato como modelo experimental deve-se ao fato deste ser um mamífero cuja morfofisiologia está bem estudada, bem como o seu comportamento característico semelhante à de outros mamíferos, conforme descrito na literatura. É importante ressaltar que sempre que possível tentamos minimizar o número de animais a serem utilizados.

Os procedimentos para a indução da ferida cirúrgica e o tratamento com os diferentes materiais, bem como as demais avaliações, foram realizadas após um período de treinamento de modo que a manipulação fosse realizada de forma rápida e precisa, a fim de evitar estresse adicional. Durante toda a experimentação foi dada uma atenção especial para qualquer sinal de alteração comportamental e/ou sofrimento dos animais. O estado geral de alimentação, limpeza e locomoção dos animais foi controlado diariamente. A utilização de anti-inflamatórios nestes modelos não é recomendada tendo em vista que pode interferir na resposta ao tratamento testado e, deste modo, prejudicar a interpretação de dados.

Seleção da amostra

Foram utilizados 36 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), provenientes do Biotério Central da UFSC, adultos (14 – 16 semanas) pesando aproximadamente 350g, considerando o planejamento estatístico para determinação do tamanho da amostra (Figura 1). Os experimentos foram

realizados no Biotério Setorial do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI) do centro de ciências biológicas (CCB) da UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas higienizadas e sob condições similares, em sala com 22°C +/- 2°C, 60% +/- 5% de umidade e em ciclo claro/escuro de 12/12h. Os ratos foram alimentados com o padrão de dieta sólida do laboratório e água. Para a realização da intervenção cirúrgica, os ratos foram distribuídos segundo o período experimental e os materiais a serem utilizados (Quadro 1).

Quadro 1: Distribuição dos grupos em relação aos períodos experimentais e os materiais a serem utilizados.

| Materiais | 1 dia (n=9) | 3 dias (n=9) | 7 dias (n=9) | 10 dias (n=9) |
|---------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Resina de Jatobá (RJ) | A1 | A2 | A3 | A4 |
| Resina do Breu Branco (BB) | B1 | B2 | B3 | B4 |
| Leite do Amapá (LA) | C1 | C2 | C3 | C4 |
| Cola Biológica (CB) | D1 | D2 | D3 | D4 |
| | E1 | E2 | E3 | E4 |
| Veículo (VH) | F1 | F2 | F3 | F4 |
| Sutura (ST) | G1 | G2 | G3 | G4 |
| Cianocrilato (CA) | H1 | H2 | H3 | H4 |
| Controle (Naive) | | | | |
| Sutura + Cola biológica (ST+CB) | I1 | I2 | I3 | I4 |

Intervenção cirúrgica

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de Ketamina 10% - 90mg/kg (Synth, Sao Paulo, Brasil) e cloridrato de Xilazina 2% - 10mg/kg (Synth, Sao Paulo, Brasil). Para padronizar a localização das incisões para cada animal, utilizou-se como modelo uma placa de acetato elaborada com as dimensões obtidas por meio de um paquímetro. Para tal foi medida a área do dorso do animal e



padronizado o número de incisões, o comprimento e a localização destas de acordo com a superfície (Figura 3). Após a tricotomia da área dorsal do animal e assepsia utilizando iodo povidine, a placa foi posicionada e, com uma caneta permanente, marcou-se na pele os dois extremos de cada incisão. Retirou-se a placa e realizaram-se quatro incisões de 2 cm de comprimento e 2 mm de profundidade com bisturi (Duflex, Brasil) contendo uma lâmina (15, BD, Brasil) (Figura 4). Todas as incisões foram realizadas pelo mesmo operador e estendidas até a hipoderme. As bordas da incisão foram divulsionadas 0,5 cm ao redor de cada ferida para permitir um adequado avanço tissular para o fechamento e igualmente para a aplicação do adesivo. A hemostasia, quando requerida, foi realizada com uma leve pressão com gaze.

As margens da ferida foram aproximadas manualmente e fechadas com sutura ou com a aplicação de cada material a ser estudado, a ordem dos quais foi randomizada. O fechamento das feridas cirúrgicas, no grupo ST, foi realizado através de quatro pontos simples em intervalos de 0,5 cm utilizando fio de nylon 5-0 (Shalon, GO, Brasil), provendo a íntima cooptação das bordas, para uma cicatrização por primeira intenção. Nos grupos experimentais RJ, VH, BB, LA, CB e CB+ST as bordas da ferida foram aproximadas manualmente e, com o auxílio de uma pipeta, foram quantificados 50 microlitros (μL) de cada material. Manteve-se a aproximação manual durante dois minutos para permitir a estabilidade do material em cada ferida (Figura 4). No grupo formado pelo CA, as bordas da ferida foram aproximadas manualmente e uma única camada do material foi aplicada ao longo da incisão, de acordo com as instruções do fabricante. Manteve-se a aproximação da ferida durante 60 segundos após a aplicação para assegurar uma adequada polimerização do material. Todas as aplicações foram realizadas por um único operador para assegurar uniformidade na execução (Figura 5).

Todos os animais receberam analgésico dipirona 50mg/kg intraperitoneal, após o procedimento cirúrgico, por três dias consecutivos, no período matutino. Os animais foram avaliados diariamente para a observação do estado de saúde e do processo de reparo para avaliar qualquer sinal clínico de inflamação (vermelhidão, edema), necrose, infecção, deiscência

ou fibrose. Todas as etapas foram fotografadas e os dados arquivados para análise dos resultados. O fechamento completo da ferida, mantendo as bordas da incisão em aposição, foi considerado como uma cicatrização primária (por primeira intenção) e o fechamento parcial como uma cicatrização secundária (por segunda intenção).

Remoção das amostras e processamento para avaliação histológica

Decorridos 1, 3, 7 e 10 dias os animais foram anestesiados como detalhado previamente. Quando requerido foi realizado uma nova tricotomia, uma área de 2 x 2,5 cm² de tecido cutâneo foi removida ao redor de cada ferida cirúrgica com bisturi contendo uma lâmina (Figura 6). As amostras foram imersas em recipientes de vidro, contendo solução de formaldeído tamponado a 10% (Sigma-Aldrich) e mantidas por 24h a 4°C para sua fixação. A Tabela 1 resume o protocolo a seguir desde a coleta das amostras até a montagem das lâminas para a análise histológica. As amostras foram desidratadas por meio da passagem em concentrações crescentes de álcool etílico para permitir a posterior passagem do meio de inclusão que não é miscível em água, imediatamente foram diafanizadas com xilol, este passo deve-se ao fato de a parafina não ser solúvel em álcool. A impregnação e inclusão consistem em substituir o xilol pela parafina. Para a inclusão, o material foi transferido para um molde contendo parafina líquida e, em temperatura ambiente, foi orientado visando o plano de corte transversal da pele. Os tempos utilizados para cada etapa se encontram esquematizados na Tabela 2. Procedeu-se à microtomia, com a obtenção de cortes semiseriados de quatro μ m de espessura. A etapa seguinte consiste na coloração do material biológico e que tem como objetivo destacar as diferentes estruturas celulares e extracelulares. Como os corantes utilizados são solúveis em água, o material deve ser novamente hidratado, colocando-se as lâminas submersas em xilol e em banhos de álcool, até a lavagem final com água. Após a coloração com hematoxilina e eosina e tricrômio de Masson, o material foi novamente desidratado com soluções crescentes de álcool e xilol (Tabela 3). Finalmente, foi aplicado o meio de montagem (Permount) e sobreposta uma lamínula de vidro para a conservação permanente do material biológico (Figura 7).



Análise das imagens histológicas

As lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE) foram examinadas ao microscópio de luz com câmera digital acoplada, com objetiva 5x, 10x e 40x para a localização e análise da área de reparo. Após a localização da região, os cortes foram fotografados com aumento de 5x e, em seguida, com aumentos de 10x e 40x para análise de quatro campos microscópicos consecutivos. Os campos microscópicos foram analisados por dois observadores previamente calibrados, percorrendo toda a extensão do tecido, analisando de forma descritiva as seguintes estruturas histológicas: epiderme (presença de figuras de mitose, re-epitelização, diferenciação dos estratos e queratinização) e derme (presença e localização de células inflamatórias, figuras de mitose, identificação dos miofibroblastos, orientação das fibras colágenas, presença de vasos sanguíneos e a degradação dos componentes adesivos).

Avaliação da cicatrização

As imagens digitais foram adquiridas usando câmera digital (Canon U.S.A., Inc.), e avaliada à área de cicatrização de cada grupo em função de cada tempo experimental (1, 3, 7 e 10 dias). Isto foi avaliado mediante um programa computadorizado (Chptool) baseado em que a área de cicatrização pode ser caracterizada através de espaços de cores adaptativos, modelados estatisticamente para discriminar com maior precisão entre áreas correspondentes a cicatrização e áreas de tecidos normais (SOBIERANSKI *et al.* 2009). Previamente, devido a que cada dorso do rato continha 4 incisões com quatro grupos diferentes, um total de 36 imagens foram editadas com um editor de imagens (GIMP 2.6) para recortar cada imagem em quatro imagens iguais e conseguir a padronização do tamanho de cada amostra. Foram obtidas um total de 144 imagens. Em seguida, cada imagem foi analisada no editor de imagens (Adobe Photoshop CS5) com o objetivo de eliminar as cores correspondentes à pele normal e conseguir assim evitar na análise colorimétrica a interferência de cores que poderiam gerar falsos positivos. Para isso, foi selecionada a área da pele normal e corada de cor branco. Finalmente cada imagem foi analisada no Chptool e quantificada à área de cicatrização em relação a área total de cada amostra (Figura 8).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média + erro padrão da média (E.P.M), utilizando o método de regressão linear através do programa “Graph Pad Prism” (2005, San Diego, CA).

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. Valores de $P < 0,05$ foram considerados indicativos de significância.



APÊNDICE B- Figuras da metodologia expandida

Figura 1

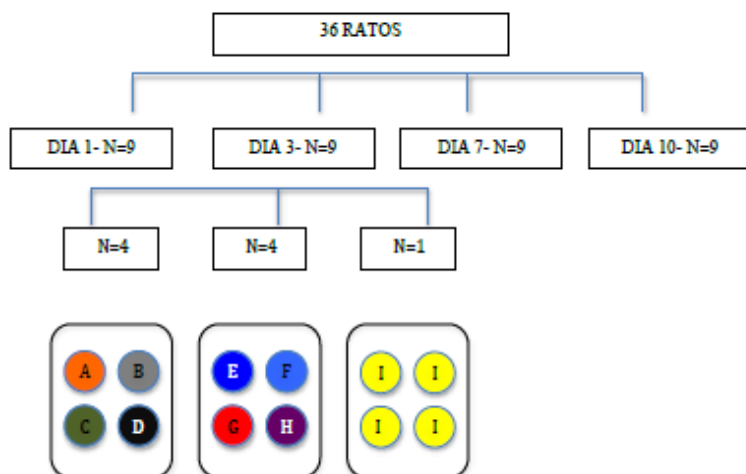
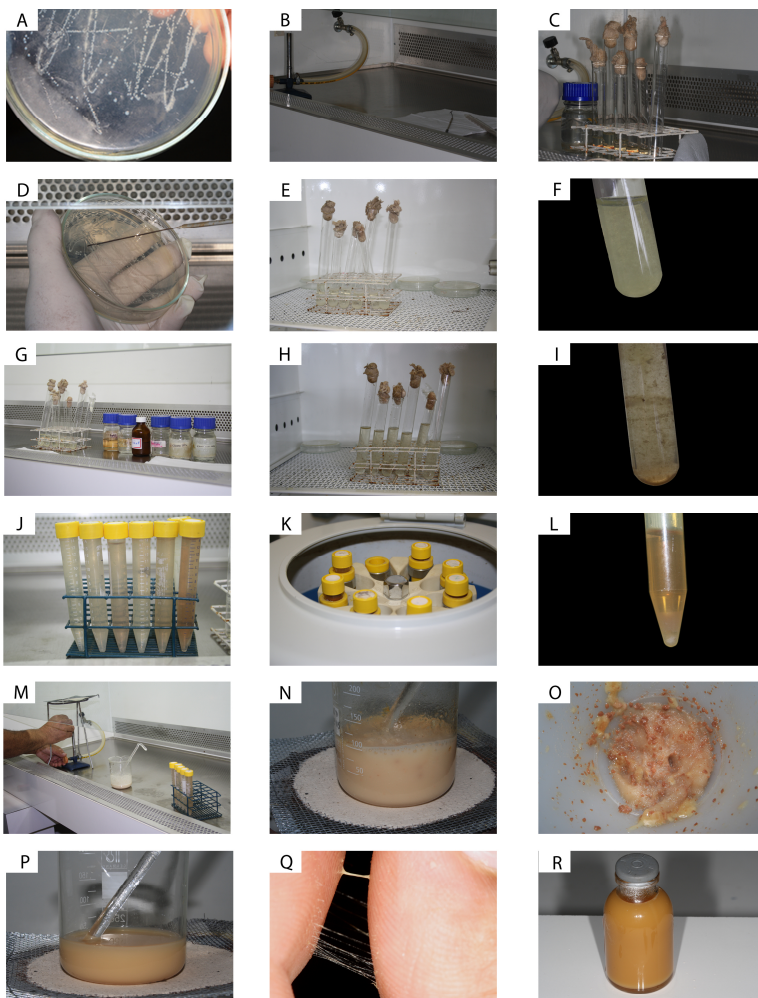


Figura 1. Esquema explicativo da metodologia utilizada



Figura 2

Figura 2. Elaboração da “cola biológica”



A- Após quatro dias de cultivo a bactéria cresce na placa petri;
 B,C,D- Na câmara de fluxo a bacteria é transportada para o meio líquido de cultivo;

E,F- Os vidros são levados na estufa de CO₂ para a bateria crescer durante uma semana;
 G- Retirar sete ml do meio e acrescentar no tubo que contém o meio líquido e a bactéria preparados na etapa(1);
 H,I- Incubar na estufa por 1,5 hora a 30 °C;
 J- Transferência do conteúdo para os tubos Falcon;
 K,L- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos;
 M- Mistura-se a porção líquida após a centrifugação e mistura feita com os extratos das resinas;
 N,O- Esquentar 20 minutos e retirar o sobrenadante;
 P,Q,R- O produto formado a partir do método e compostos acima descritos é um adesivo tissular, ou cola biológica.

Figura 3

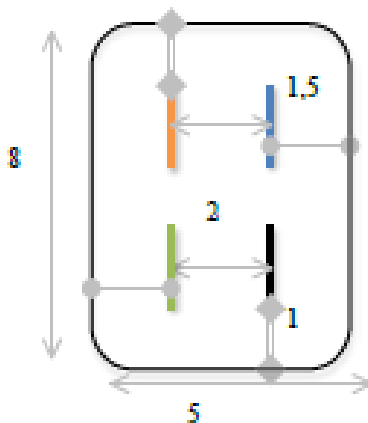


Figura 3. Localização das incisões no dorso do animal



Figura 4

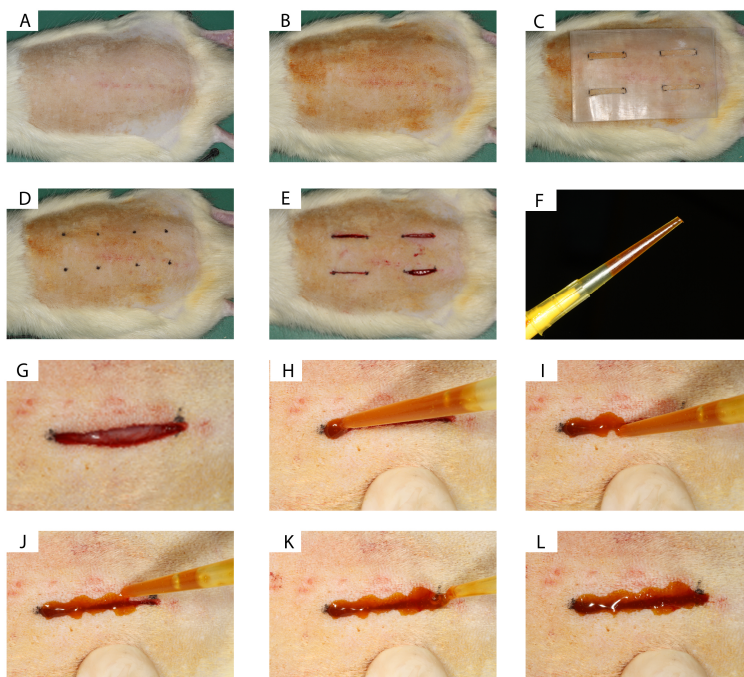


Figura 4. Aplicação da “cola biológica”.

A- Tricotomia do dorso do animal;

B- Preparo asséptico da área utilizando gaze embebida em iodo povidine;

C, D- Placa de acrílico posicionada no dorso e com uma caneta permanente marcou-se na pele os dois extremos de cada incisão;

E- Uniram-se as marcações com bisturi contendo uma lâmina 15;

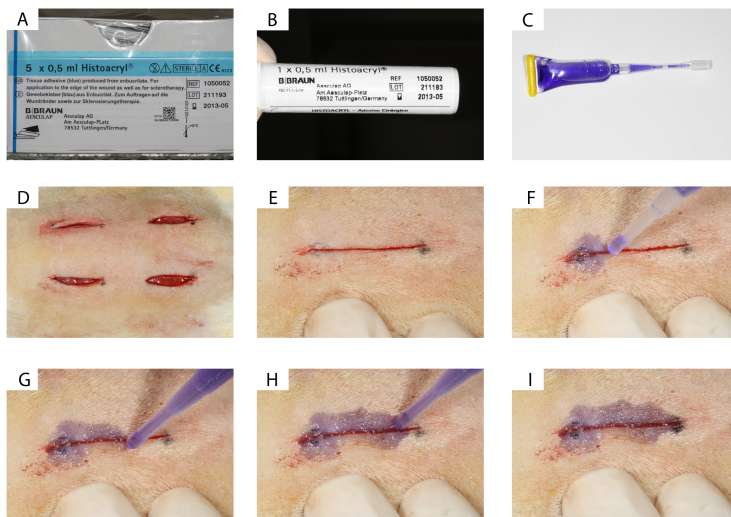
F- Com o auxílio de uma pipeta foram quantificados 50 μ L do material;

G- Incisão na epiderme e derme da pele do rato;

H- Aproximação manual das bordas de incisão e início da aplicação de 50 μ L do material previamente quantificada com uma pipeta;

I, J, K- A aplicação estende-se ao longo da incisão mantendo a aproximação manual;

L- Aguarda-se dois minutos para permitir a cooptação das bordas.

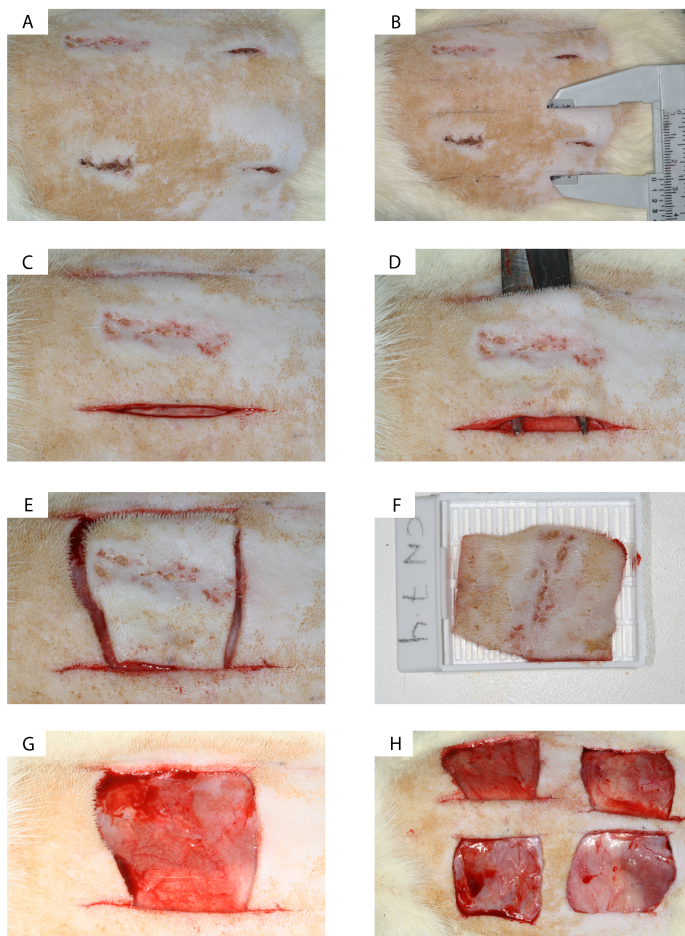
Figura 5**Figura 5.** Aplicação do Histoacryl®.

A,B,C- Histoacryl® e Histoacryl® Blue são fornecidos em ampolas de 0,5 ml. Cada caixa contém cinco ampolas. Cada ampola é selada dentro de uma embalagem, assim o exterior da ampola pode ficar estéril.

D- Aproximação manual das bordas de incisão. Histoacryl® permanece líquido até exposto ao tecido

E, F, G- Aplicação na epiderme ao longo da incisão mantendo à aproximação manual; H- Aguarda-se 60 segundos até finalizar a polimerização;

I- Aspecto final após a polimerização.

**Figura 6****Figura 6.** Remoção das amostras.

A- Nova tricotomia da área central do dorso do animal e preparo asséptico com iodo povidine;

B- Com o auxílio de um paquímetro e uma caneta permanente realizaram-se marcações paralelas a ambos lados da linha de incisão, ambas marcações estavam a uma distância de 2,5cm;



C,D- Com um bisturi contendo uma lamina 15C fez-se a incisão na pele até a tela subcutânea, ou hipoderme. Uma pinça clinica segurou o tecido de um lado e com ajuda de umas tesouras divulsionou-se as fibras que ancoram a hipoderme ao tecido muscular até conectar ambas incisões.

E,F- Foram realizadas duas incisões perpendiculares as primeiras com a distancia entre ambas do tamanho da incisão cirúrgica (dois cm);

G,H- aspeto do tecido subcutâneo uma vez removida a biopsia excisional.



Figura 7

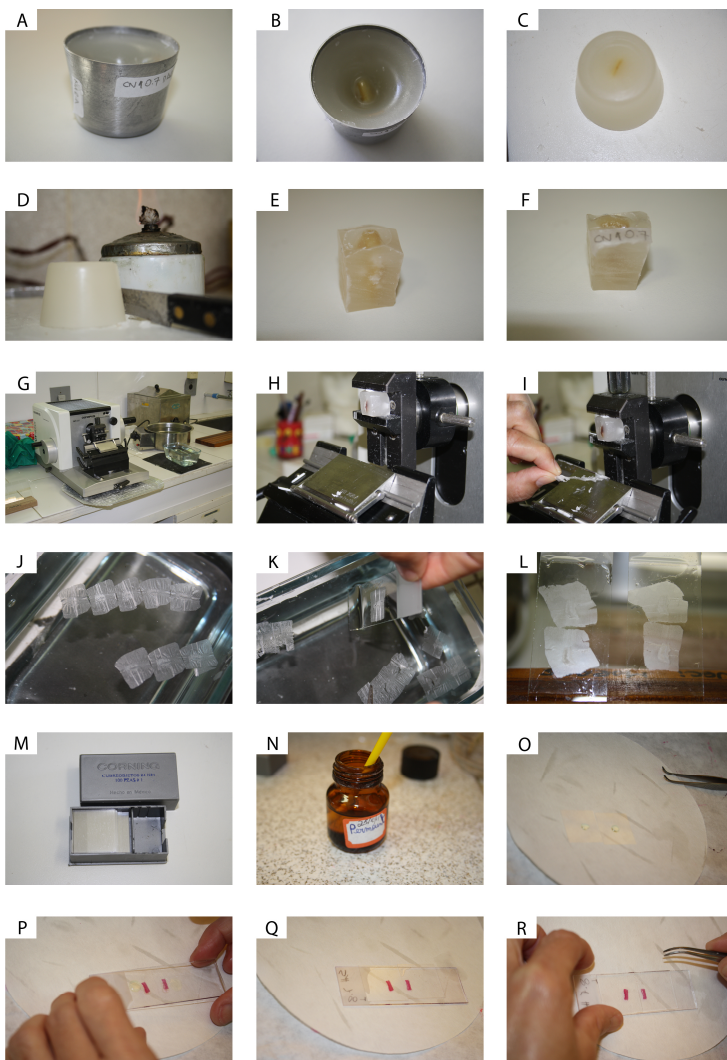


Figura 7. Preparo das peças para à microtomia e montagem das laminas.



A,B,C- Foi realizada a inclusão em parafina e orientação específica para obter cortes transversais;

B,C,D- Aquece-se uma faca e recorta-se o bloco em formato de pirâmide para facilitar a orientação da peça no micrótomo;

G,H,I Posiciona-se o bloco no micrótomo e retira-se primeiramente o excesso de parafina até chegar na área de interesse, que corresponde da parte inicial até aproximadamente a metade da incisão. Realizam-se cortes de 4µm de espessura semiseriados;

J,K- Cada série de cortes ("tênicas") é levada para um recipiente contendo água corrente a temperatura ambiente. As "tênicas" foram colocadas em um recipiente de vidro com água à temperatura ambiente para estender os cortes e, com o auxílio de uma pinça clínica, os mesmos foram separados e "pescados" com as lâminas de vidro.

L- As lâminas foram mantidas em estufa à 45°C ou colocadas sobre uma placa aquecida para favorecer a desparafinização. Essa etapa ajuda a fixar os cortes nas lâminas e facilita a hidratação.

M- Procedesse então as etapas de hidratação, coloração, desidratação e montagem da lâmina.

N,O- Colocou-se duas gotas de resina (Permunt ®) em cada lâminula

P,Q,R- Posicionou-se a lâmina sobre as lâminulas.



Figura 8

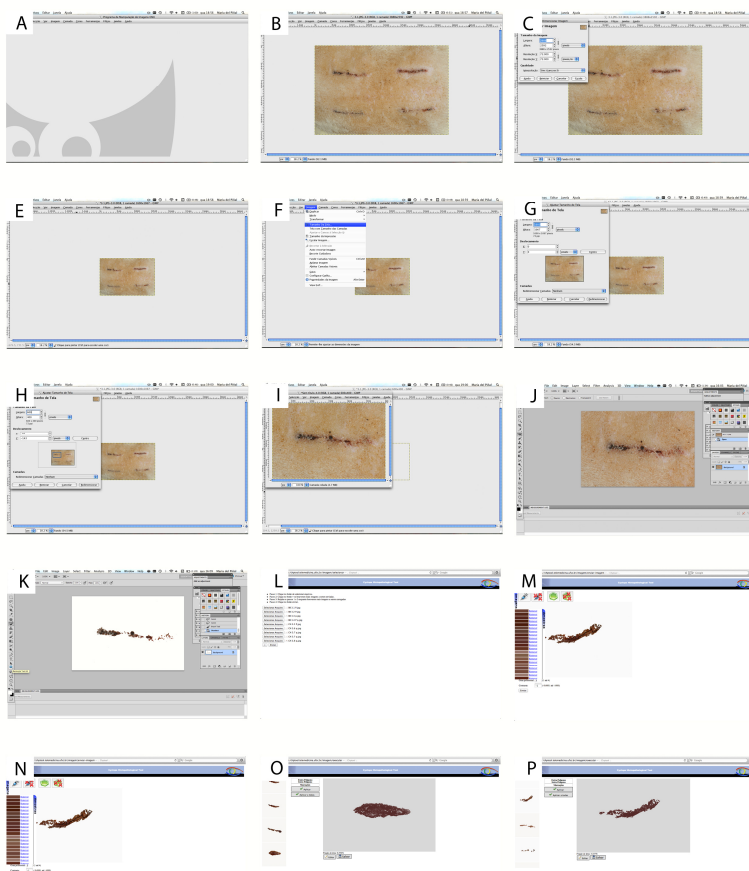


Figura 8. Processamento das fotografias para avaliação da área de cicatrização.

A- Devido a que cada fotografia do dorso do animal continha quatro incisões, era necessário para avaliação da cicatrização a individualização de cada uma delas, pois correspondiam a grupos de estudo diferentes. O programa de manipulação de imagens GIMP 2.6 permite obter a partir de uma fotografia inicial 4 imagens idênticas em tamanho.

B, C, D- Inicialmente é diminuído o tamanho da imagem inicial.

F,G,H,I- Individualiza-se cada incisão e obtém-se imagens individuais de cada grupo.

J,K- Seguidamente cada imagem foi analisada no editor de imagens (Adobe Photoshop CS5) com o objetivo de eliminar as cores correspondentes a pele normal e conseguir assim evitar no análise colorimétrico a interferência de cores que poderiam gerar falsos positivos. Para isso, foi selecionado a área da pele normal e corada de cor branco.

L- Cada imagem foi analisada no Chptool e quantificada a área de cicatrização em relação a área total de cada amostra.

M, N- São selecionados numerosos pontos que o programa vai memorizar como cores. Quando aproximadamente 50 pontos são selecionados realiza-se o análise.

O, P- A área de cicatrização é quantificada em relação a área total. Observa-se a diferença na área dada pelo programa entre as duas imagens.



APÊNDICE C- Tabelas da metodologia expandida

Tabela 1

| Ordem | Processo |
|-------|--|
| 1º | Coleta e dissecação |
| 2º | Fixação: glutaraldeído, formaldeído |
| 3º | Desidratação: concentrações de álcool crescentes |
| 4º | Diafanização: xilol |
| 5º | Inclusão: parafina |
| 6º | Emblocagem: parafina |
| 7º | Microtomia |
| 8º | Diafanização: xilol |
| 9º | Hidratação: concentrações decrescentes de álcool |
| 10º | Coloração |
| 11º | Desidratação: concentrações de álcool crescentes |
| 12º | Montagem |

Tabela 1. Resumo do processamento para avaliação histológica

Tabela 2

| Ordem | Material | Tempo |
|-------|--------------|--------|
| 1º | Álcool 92,8% | 1 hora |
| 2º | Álcool 92,8% | 1 hora |
| 3º | Álcool 100% | 1 hora |
| 4º | Álcool 100% | 1 hora |
| 5º | Xilol | 1 hora |
| 6º | Xilol | 1 hora |
| 7º | Parafina I | 1 hora |
| 8º | Parafina II | 1 hora |
| 9º | Parafina III | 1 hora |

Tabela 2. Protocolo para o tratamento e preparo das amostras para análise histológica.

Desidratação (1º,2º,3º,4º);

Diafanização (5º,6º);

Impregnação e inclusão (7º,8º,9º).

**Tabela 3**

| Ordem | Material | Tempo |
|-------|-----------------------------|-------------|
| 1º | Xilol comum | 10 minutos |
| 2º | Xilol I | 5 minutos |
| 3º | Xilol II | Só passagem |
| 4º | Álcool 100% | 3 minutos |
| 5º | Álcool 95% | 3 minutos |
| 6º | Álcool 70% | 3 minutos |
| 7º | Lavagem com agua corrente | 10 minutos |
| 8º | Submergir na agua destilada | Só passagem |
| 9º | Hematoxilina | 2 minutos |
| 10º | Lavagem com agua corrente | 5 minutos |
| 11º | Eosina | 30 segundos |
| 12º | Agua destilada | Só passagem |
| 13º | Álcool 95% | Só passagem |
| 14º | Álcool 100% | 3 minutos |
| 15º | Álcool 100% | 3 minutos |
| 16º | Xilol I | 3 minutos |
| 17º | Xilol II | 3 minutos |
| 18º | Xilol montagem | 5 minutos |
| 19º | Montagem | |

Tabela 3. Protocolo para corar as laminas.

A coloração inclui a diafanização (1º,2º,3º);

Hidratação (4º,5º,6º);

Coloração (9º,10º,11º);

Desidratação (13º,14,15º);

Diafanização (16º,17º) e

Montagem (19º).



APÊNDICE D- Obtenção dos extratos vegetais (resinas) e elaboração da cola biológica

Os extratos vegetais de três árvores, foram preparados conforme técnicas padrão de extração *in loco*. A forma de extração das resinas e do látex do Amapá-doce procedem da mesma forma como se extrai o látex das seringueiras. São feitos cortes verticais no caule da árvore, e as substâncias são coletadas. Em seguida, os extratos foram devidamente acondicionados e transportados até laboratórios do departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Então, o preparo de uma mistura adesiva, a partir dos 3 extratos anteriormente descritos, foi elaborado da seguinte forma: após a associação dos extratos individuais, a mistura foi submetida à fermentação com colônias de *Caulobacter crescentus*. (bactéria gram-negativa), cujo habitat inclui todos os ambientes aquáticos e muitos tipos de solo, e tem sido extensivamente estudada por seu ciclo celular único, no qual duas células-filhas distintas são geradas através de diferenciação e de divisão celular assimétrica. Esta bactéria se encontra presente na maioria dos organismos vivos, e não é patogênica (Poindexter, 1978; Poindexter, 1981). Finalmente, a mistura foi submetida a um processo enzimático obtendo-se uma forma pastosa, de cor castanha escuro, com característica adesiva.

A etapa inicial, aqui denominada de **etapa(1)**, deve ser preparado o meio líquido de cultura da bactéria. O meio líquido é composto por:

- 0,05 gr de peptona,
- 0,032 gr de extrato de levedura (*Sacchariomyces cerevisiae*),
- 0,006 gr de sulfato de magnésio ($MgSO_{4.7}H_2O$)
- 0,01% $CaCl_{2.2}H_2O$.
- 0,46 gr de Agar
- 32 ml de água

A placa é levada com a bateria para a estufa durante 4 dias. O seguinte passo consiste em transportar a bactéria para um meio líquido (Figura 1).



Para produzir 1 litro do meio líquido de cultura, deve seguir os seguintes procedimentos:

- Adicionar 2g de peptona,
- Adicionar 1g de extrato de levedura,2
- Adicionar 1 ml de solução $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e
- Adicionar 1 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 10%
- Adicionar 1 l de água deionizada;
- Autoclavar por 20 minutos;
- esperar resfriar a 55 °C e
- adicionar 2 g/ml de cloranfenicol;
- armazenar o meio em temperatura ambiente;
- utilizar 5 ml do meio líquido em cada tubo, acrescentando a bactéria *Caulabacter Crescentus*;
- Incubar em estufa a 30 °C por 48 horas, intercalando 12 horas no claro e 12 horas no escuro.

A **etapa(2)** consiste na preparação do meio, neste caso sendo mostrado as especificações para o preparo de 1000 ml do dito meio, compreendendo os seguintes compostos:

- 5 ml de 1M imidazole;
- 20 ml da base concentrada de Hutner (100%) 2%;
- 7,5 ml da D-glicose 10%;
- 15 ml do glutamato de sódio 10%
- 10 ml de 1M NH_4Cl
- 60 µl de fosfato (500mm)

Após a realização das preparações descritas é preparado o adesivo por meio do seguinte método (Figura 1):

- Autoclavar o meio de HIGG, preparado na inicio da etapa(2), por 20 minutos;
- Deixar esfriar;
- Retirar 7 ml do meio de HIGG e acrescentar no tubo que contém o meio líquido e a bactéria preparados na etapa(1);
- Acrescentar 1,5 ml de ágar;
- Incubar na estufa por 1,5 hora a 30 °C;
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos;
- Separar o sobrenadante do precipitado;
- Em 70 ml do precipitado, acrescentar 5 g de Resorcina e 70 g de gelatina comestível sem sabor;



- Em 50 ml do precipitado acrescentar 5 ml da Base de Hutner com vitaminas, 5 ml de fosfato, 1 g de dextrina, 0,2 ml de lactose, 3 ml de quitosana, 3 gotas de limão, 1 ml do “leite do Amapá”, 1 ml do “breu branco” e 1 ml da “resina de jatobá”, 1 ml ácido salicílico;
- Autoclavar a esta mistura por 20 minutos;
- E colocar no erlenmeyer deixando concentrar até reduzir;
- Após reduzir, misturar a porção líquida com a parte sólida para formar a cola.
- Deixar esquentar até obter uma mistura homogênea e adesiva
- O produto formado a partir do método e compostos acima descritos é um adesivo tissular, podendo ser utilizadas em tecidos moles e duros com excelentes respostas à cicatrização dos tecidos pelo fato das propriedades antiinflamatórias e antimicrobianas dos componentes da dita mistura (Figura 1).



ANEXO A- Normas do Periódico

All manuscripts should be submitted online at <http://ees.elsevier.com/surg/>. Please note: Submitted manuscripts may be screened by one of several electronic programs for overlap in content or writing with published articles.

The policies and procedures for SURGERY generally follow those of the International Committee of Medical Journal Editors, as published in the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication" (updated October 2008; www.jcmjc.org).

Manuscripts are considered for publication if and only if the article and its key features (1) are not under consideration elsewhere, (2) have not been published, and (3) will not appear in print or online prior to appearing in SURGERY. This restriction does not apply to abstracts or posters published in connection with scientific meetings; in addition, press reports arising from a conference will not be considered prior publication, provided that authors who discuss their conference presentation or poster with reporters are careful not to offer more detail about their work than was contained in the oral or poster presentation.

Submission of a manuscript is understood to indicate that the authors have complied with all policies as delineated in this document. Individuals who violate these policies are subject to editorial action including but not limited to (1) disclosure of violations to employers, funding agencies, or other journal offices and/or (2) publication of a retraction, correction, editorial expression of concern, or editorial.

When a manuscript is received by SURGERY that has at least one author who is also one of the Editors-in-Chief of the Journal, or is from one of the Editors-in-Chief's institutions, that Editor will recuse himself from any editorial responsibilities for the manuscript. In addition, individuals who have potential conflicts of interest with any manuscript sent to them for review are asked to recuse themselves from serving as peer reviewers.

The Journal invites concise, original articles of new matter in the broad field of clinical and experimental surgery as well as surgical organization, and history. We are especially interested in articles on surgical education. Emphasis for acceptance includes conciseness and clarity of presentation as well as appropriateness of English usage.

All authors must observe most strictly the rules against dual publication.

Original Communications. These manuscripts should represent original research, either clinical or basic science. Consideration for publication is based on originality, scientific content, and appropriate analysis. Emphasis should be placed on novel and new information.

Brief Clinical Reports, Case Reports, and Images in Surgery. Manuscripts for these sections should be limited strictly to no more than four double-spaced manuscript pages with up to five references. The articles could include one or two pertinent illustrations but no abstract. Follow the guidelines for original communications. Please note, SURGERY rarely publishes case reports and the ones published should be either of timely relevance or of significant educational value. The Journal is very selective in choosing a case report for publication.

Editorials. Editorials should be concise and brief (not to exceed 1000 words, except under unusual circumstances) and should express the personal opinion of the author. An editorial should contain a minimum of references, if any. Editorial material to be considered by the Editors may include not only timely subjects of clinical interest, but also material of general interest to the surgical community, including topics of social significance. Follow the guidelines for original communications. Most editorials are "invited" or "solicited" by the Editors; i.e., the Editors have asked a specific person to write an editorial. Unsolicited editorials will be considered, but will be screened highly by the Editors.

Letters to the Editors. The Editors invite comments in the form of letters that express differences of opinion or supporting views of previously published editorials or recently published papers in SURGERY. Each letter must not exceed 500 words, should be typed with double spacing, and must include complete references. The editorial board reserves the rights to accept, reject, or excerpt letters without changing the views expressed by the writer. No anonymous correspondence will be published; therefore each author should include his or her complete address.

Clinical Reviews: SURGERY does not often publish simple review papers based solely on a literature review. On occasion, the Editors will solicit a clinical review on a specific topic. Exceptions include formal true systematic reviews (not



just review articles) which are well-executed and either relevant or timely; however, these will be reviewed critically.

Societal Papers. Manuscripts submitted as part of the annual meetings of the Society of University Surgeons (SUS), Central Surgical Association (CSA), or American Association of Endocrine Surgeons (AAES) have other, somewhat different guidelines because of space limitations. Societal manuscripts should have an abstract of no more than 200 words, no more than 10 double-spaced text pages, no more than 25 references, and no more than a total of 10 tables and figures combined. The option does exist for additional tables, figures, or text when deemed necessary and appropriate by the Editors, to be included in the electronically published version that, however, would not appear in the printed version. Such additional material must be designated clearly as "For the online version of the article, not to be included in the print version."

Hypothesis Section. This section hopes to challenge "established" concepts and postulate novel ways of thinking about problems in the hopes of changing surgical tradition when appropriate. We will review and critique these submissions carefully. We anticipate few acceptances and irregular appearance, if and only when a good idea surfaces. Working with Alden Harken, who will serve as the managing editor of this section, we have established the following criteria for submission. Please note: all submitted manuscripts in this Hypothesis section must follow the outline described; those manuscripts that do not follow this outline will be returned. (1) The Hypothesis (typically also the title of the manuscript) must lead off the introduction of the manuscript and will be typed **IN BOLD**, and (2) the idea should be presented succinctly, with the upper limit of 10 double-spaced typed pages with no more than 12 references.

Reprints. Individual reprints of an article may be obtained directly from the author. Surgery does not publish book reviews.

Book reviews. Books shall be reviewed only at the discretion of the Editors.

Review: Usually at least three (and often more) referees are asked to review each article. Acceptance for publication is based on originality, significance, and scientific merit; these manuscripts should further the knowledge and practice of surgery. Revisions may be made to add clarity

and understanding without altering the meaning and to follow an overall editorial approach by SURGERY.

Manuscripts describing research involving human subjects must document both IRB approval/exemption and that informed consent was obtained from patients who served as subjects of the investigation. A statement about HIPAA compliance is also necessary for human studies from the United States and other countries in which the protection of patient information by obtaining patient consent is required by law. In the event that either the Editors or referees question the propriety of the human investigation with respect to the risk to the subjects or to the means of obtaining informed consent, SURGERY may request more detailed information about the safeguard employed and the procedures used to obtain consent. Minutes of the local human experimentation committees that reviewed and approved the research may also be requested.

Online manuscript submission. All manuscripts should be submitted online. Please go to <http://ees.elsevier.com/surg/> and, register, log in, and follow the instructions. When uploading your manuscript on the site, please be aware of the following: • MS Word is the preferred word-processing program. Please do not upload anything as a PDF file; the system will build a PDF for you. • All text elements (title page, abstract, main text, references, appendices, figure legends, and tables) should be in a single file.

Bullet item-Number pages consecutively and double-space text.

• Each figure file should be created at the proper resolution (see guidelines below) and uploaded as a separate file (TIFF or EPS are the preferred formats). • The comments section should include the names, affiliations, and email addresses of three potential reviewers. The Editors will make every effort to have one or more of these suggested reviewers serve as a formal reviewer of your manuscript.

The following format must be used for all submitted manuscripts:

-- The *cover letter* should provide (1) the category of manuscript (i.e., original report, brief clinical report, etc); (2) statement that the material has not been previously published or submitted elsewhere for publication and will not be sent to another journal until a decision is made concerning publication by SURGERY; (3) information about any personal conflicts of interest of any of the



authors; and (4) names of sources of outside support for research, including funding, equipment, and drugs. The cover letter should be submitted as a separate file. Any financial support whatsoever from industry must be acknowledged as a financial disclosure of all the authors in the cover letter and on the title page of the manuscript. For instance, if a study is funded partially or totally by Industry, this needs to be stated clearly followed by a statement disclosing whether or not each author has any financial interest in the company (etc) funding the study. It will be the Editors' discretion whether or not this represents too much of a conflict of interest to warrant publication.

-- The *title page* should include the full name and highest achieved degree of each author, the institution from which the work originated, sources of financial support, and the exact and complete address, business and home telephone numbers, e-mail address, and fax number of the one author who will be responsible for correspondence, galley proofs, and reprint requests.

-- A *structured abstract* of no more than 250 words must accompany the manuscript and consist of four paragraphs, each with its introductory label: Background (stating the purpose of the study), Methods, Results, and Conclusions. This abstract should be numbered page two of the manuscript. Abstracts are only necessary for Original Communications and Societal papers.

-- *Standard abbreviations* should be used consistently throughout the manuscript. The use of unusual abbreviations is discouraged but, if necessary, the term should be spelled out in full the first time it appears, followed immediately by the abbreviation in parentheses. The abbreviation only should be used from that point on. A separate page of all abbreviations used is suggested to aid the manuscript reviewers. For currently accepted usage, consult the Manual of Style of the American Medical Association; Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers; and the Chicago Manual of Style by The University of Chicago Press.

-- *Illustrations* should be submitted electronically. When submitting the illustrations electronically, please use either an EPS or TIFF file format. Graphics software such as Photoshop and Illustrator should be used to create art. Figures submitted using presentation software such as PowerPoint, CorelDraw, or Harvard Graphics

are not acceptable. **Color images need to be saved as CMYK, at least 300 dots per inch (dpi). Grayscale images should be at least 300 dpi.** Line art (black and white or color) and combinations of grayscale and line art should be at least 300 dpi. Make sure that the figure number is marked clearly on the figure or part of the electronic file name (i.e., Figure1.tif). Please note that once you create digital art at low resolution, you cannot adjust it. **You must create your art at the proper resolution (300 dpi) to begin with.** For step-by-step instruction and screenshots on how to create your art correctly the first time, go to Elsevier's Author Gateway (<http://www.elsevier.com/artwork>) and click on "Artwork Instructions."

Figures must be cited in the text and numbered in order of first mention. A reasonable number of black-and-white illustrations will be produced free of charge; however, please note that special arrangements must be made with the Editors and publisher for color plates or extra illustrations. The cost of color illustrations is usually borne by the authors. Please note that the figures in the online version of the Journal will be reproduced in color, free of charge.

-- *Legends* must be provided for all illustrations. The legends should not appear anywhere on the figure. If a figure has been previously published, the legend must give full credit to the original source. Permission from the copyright holder for reproduction in your article must be submitted with your manuscript.

-- *Tables* should be numbered in the order in which they are mentioned in the text, and given a brief, descriptive title. Omit all horizontal or vertical rules from the body of the table. Glossy prints and reduced versions of typewritten tables are unacceptable. All acronyms, abbreviations, and unusual units of measurement used in the title, headings, or body of the table should be fully explained in a footnote. For footnotes, use these symbols in sequence: *, †, ‡, §, ?, ¶, #, **, ††, superscript lowercase letters. If a table or any data therein have been previously published, a footnote to the table must give full credit to the original source.

-- *Additional material only for electronic version:* Under exceptional or special circumstances, SURGERY will allow publication of additional tables, figures, or text (e.g. methodology, explanations of analysis, etc) in the electronic version of the published



manuscript only. This material will not be included in the print version, but a reference to it being available online will be present in the print version. The Editors would like to emphasize that such additional material will have to meet strict criteria to be included in the electronic version; such material may be used to complement the data in the printed version. If deemed by the authors or editors as crucial to the interpretation of the manuscript, this material should be included as part of the printed version of the manuscript. Please mark clearly in the submitted manuscript that this is additional information to be published electronically. The electronic version should not be used as a repository for redundant or unnecessary data.

-- *Video Clips for electronic version.* We will accept relevant video clips with accepted manuscripts for viewing in our online version of the Journal. For more information on the specific file requirements, please go to Author's Gateway for Elsevier's Artwork Instructions: <http://www.elsevier.com/artwork> . Once there, click on "Movies/animations" under "Multimedia files" from the menu on the left-hand side.

-- Only *references* cited in the text should be included in the reference list; cite references in the text by superscript numbers. The reference list must be numbered according to the order of mention of references in the text. The list format should conform to that set forth in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Vancouver style) (<http://www.icmje.org>). Do not cite as a reference any work that has not been published or accepted for publication. Manuscripts in preparation or submitted (but not yet accepted for publication) are not acceptable as a reference nor are oral presentations. Manuscripts fully accepted for publication but not yet published should be cited as "in press." Note that journal abbreviations must follow the style used in the Cumulated Index Medicus. For periodical references, give the surnames of authors and their initials, title of article, publication name, year, volume, and inclusive page numbers. For books, give the surnames of authors and their initials, chapter title (if applicable), editors' surnames and initials, book title, volume number (if applicable), edition number (if applicable), city of publisher, full name of publisher, year of publication, and inclusive page numbers of citation.

Examples (if six or fewer authors, list all; if seven or more, list first six and add "et al."):

For journals: Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

For books: Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

For chapters: Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p 465-78.

-- *Direct quotations, tables, or illustrations* that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author along with complete information as to source. Photographs of identifiable persons must be accompanied by signed releases showing informed consent. Articles appear in both the printed and online versions of the journal, and wording of the release should specify permission in all forms and media. Failure to get electronic permission rights may result in the images not appearing in the online version.

Disclosure of Financial Interests and Potential Conflicts of Interest. SURGERY requires all authors to provide full disclosure of any and all biomedical financial interests. Further, we require all authors on all types of articles (including letters) to specify the nature of potential conflicts of interest, financial or otherwise. This disclosure includes direct or indirect financial or personal relationships, interests, and affiliations relevant to the subject matter of the manuscript that have occurred over the last two years, or that are expected in the foreseeable future. This disclosure includes, but is not limited to, grants or funding, employment, affiliations, patents (in preparation, filed, or granted), inventions, honoraria, consultancies, royalties, stock options/ownership, or expert testimony. This policy of full disclosure is similar to the policies of the International Committee of Medical Journal Editors, the Journal of the American Medical Association, and other such organizations. The conflict of interest statements should be included in the Financial Disclosures section of the manuscript at the time of submission for all article



types. If an author has no conflicts of interest to declare, this must be explicitly stated. Authors should contact the Editorial Office with questions or concerns, but should err on the side of inclusion when in doubt. The following is a sample text:

Dr. Einstein reports having received lecture fees from EMC Laboratories, and research funding from Quantum Enterprises. Dr. Curie disclosed consulting fees from RA Inc. Dr. Newton reported his patent on "Newtonian physics". Dr. Archimedes reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

The submitting author will be required to indicate that this information has been fully included in the manuscript at the time of submission. In addition, all authors are required to acknowledge that the conflict of interest disclosures are complete for both themselves and their co-authors, to the best of their knowledge, when completing the Manuscript Submission Form. Manuscripts that fail to include the complete statements of all authors upon submission will be returned to the corresponding author and will delay the processing and evaluation of the manuscript.



ANEXO B- Produção científica durante o Mestrado

1. Artigos completos publicados

1) ENCARNAÇÃO, IC, BULLEN CEM, LUNA, MP., PEREIRA-NETO, ARL., CORDERO, E. B.; CABRERA, AEB, MAGINI, RS. Aumento horizontal com osso xenógeno em bloco: alternativa viável ao uso de osso autógeno. **Implant News**, v. 8, p. 339-343, 2011.

2) LUNA, MP., ENCARNAÇÃO, IC, FERREIRA, RW, SOUZA, JGO, PEREIRA NETO, ARL., CORDERO, EB, Magini, RS. Estética e previsibilidade dos enxertos conjuntivos subepiteliais no recobrimento radicular. **Perionews**, v. 5, p. 279-286, 2011.

3) ENCARNAÇÃO, IC; LUNA, MP; MOLINA, IC, CARDOSO, AC. Arco Dental Reduzido: Conceitos e Atualidades - Revisão da Literatura. **Dental Press Periodontol. Implant Dent**, 5(4):46-53, 2011.

2. Produção de Anais

1) CID, CMO; MOLINA, IC; CORDERO, EB; BENFATTI, CAM.; ENCARNAÇÃO, IC; MELLO, EV; LUNA, MP.; BIANCHINI, MA. Bone loss around implant-supported fixed prosthesis in edentulous jaws. In: IADR/AADR/CADR 89th General Session, 2011, San Diego, California. J Dent Res Issue, 2011. v. 90.

2) ENCARNAÇÃO, IC; LUNA, MP.; CID, RMO; MELLO, EV; DALAGO, HR; BENFATTI, CAM.; MAGINI, RS.; BIANCHINI, MA. Satisfação do paciente e o impacto da saúde oral na qualidade de vida após implantes unitários em dentes anteriores. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2011, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2011. v. 25. p. 255-255.

3) CID, RMO; DALAGO, HR; MELLO, EV; SCHULDT-FILHO, G; ENCARNAÇÃO, IC; LUNA, MP.; MAGINI, RS.; BIANCHINI, MA. Avaliação clínica e radiográfica relacionados com a quantidade de mucosa ceratinizada em diferentes superfícies de implantes. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2011, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2011. v. 25. p. 256-256.



4) ENCARNAÇÃO, IC; PEREIRA NETO, ARL.; CRUZ, ACC; SIMÕES, CMO ; ARAGONEZ, A; SELLA, GC; CORDERO, EB; LUNA, MP. Análise do grau de proliferação e viabilidade de fibroblastos humanos gengivais cultivados sobre membranas absorvíveis. In: 27a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research (Proceedings of the 27aSBPqO Annual Meeting). São Paulo, 2010. v. 24. p. 283-283.

3. Apresentação de trabalhos

LUNA, M. P. ; Cardoso AC . como utilizar los principios oclusales en el diagnostico, planificación y tratamiento de las rehabilitaciones orales en la prótesis sobre implantes. 2010. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

4. Outras produções bibliográficas

Cardoso AC ; **LUNA, M. P.** . Oclusión en la implantologia: una guia simple y muy practica. Sao paulo: Santos, 2011. (Tradução/Livro).

5. Participação em eventos

National Symposium Osteology São Paulo. Clinical concept in the oral tissues regeneration 2012 (Congresso)

XXIV congresso brasileiro de periodontologia e 9TH Isbor meeting. 2011. (Congresso).

IN 2011- Latin American Osseointegration Congress. 2011. (Congresso).

SEPES. 40 reunión anual de la sociedad española de protesis estomatológica y estética2010. (Congresso).

2 congresso internacional da revista clinica. 2010. (Congresso).

Mistura Fina. 2010. (Congresso)

Curso internacional de perio-implante. 2010. (Congresso).

Mistura Fina. 2010. (Congresso).

4 congresso internacional de odontologia de santa catarina. 2009. (Congresso).